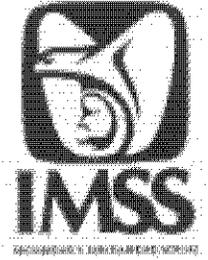




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI



PROGRAMA ÚNICO DE ESPECIALIZACIONES MÉDICAS

**RELACIÓN DE LA PRESENCIA DE CD44 Y ALDH1 CON EL TIPO HISTOLÓGICO Y SUBTIPO
MOLECULAR DE TEJIDOS CON CÁNCER DE MAMA.**

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Para obtener el diploma de

Especialista en Genética Médica que

PRESENTA

Dra. Judith Alejandra Ballésteros Romero

Tutor de Tesis: Dr. Fernando Minauro Sanmiguel
Doctor en Ciencias Biomédicas, Laboratorio de Genética.

Colaboradores:

Dr. Diego J. Arenas Aranda

Jefe de la Unidad en investigación Médica en Genética Humana

Dr. Javier Torres López

Jefe de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitaria.

M.C. Flor Elizabeth Vázquez

Estudiante de Doctorado Laboratorio de Infectología.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
PROGRAMA ÚNICO DE ESPECIALIZACIONES MÉDICAS



RELACIÓN DE LA PRESENCIA DE CD44 Y ALDH1 CON EL TIPO HISTOLÓGICO Y SUBTIPO MOLECULAR DE TEJIDOS CON CÁNCER DE MAMA.

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

P R E S E N T Ó EXAMEN DE TESIS

Dra. Judith Alejandra Ballesteros Romero
CON LOS SIGUIENTES SINODALES

Presidente Dra. María Antonieta de Jesús Araujo Solís

Secretario Dra. Julia Rocío Herrera Márquez

Vocal Dr. Alan Cárdenas Conejo

Vocal Dra. Haydeé Rosas Vargas

INDICE

	Pág.
Introducción	3
Justificación, Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos	
Metodología	10
Diseño del estudio	11
Aspectos éticos y factibilidad	13
Metodología	14
Resultados	15
Discusión	25
Conclusiones	29
Bibliografía	30
Anexo	34

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama tiene una incidencia de 124 por 100,000 mujeres por año, lo que le coloca como la causa más frecuente de cáncer en mujeres a nivel mundial y en México (1). La mortalidad en Estados Unidos es de 24 por 100,000 mujeres al año, la edad media del diagnóstico es de 61 años y la media de muerte por cáncer de mama es de 68 años (1). Según las estadísticas a nivel mundial una de cada ocho mujeres desarrollará cáncer de mama en algún momento a lo largo de su vida (1). De 180,000 casos de cáncer de mama diagnosticados al año en Estados Unidos, 41,000 fallecerán a causa de ésta enfermedad y el 40% tendrá recurrencia del cáncer (2). En mujeres hispanas la incidencia es de 89.6 por 100,000 mujeres por año, en México es de 41.8 por 100,000, la edad media del diagnóstico es de 51 años y la edad promedio de fallecimiento es de 58 años. (3). La tasa de mortalidad va de 10-13.1 por 100,000 mujeres (4). La mayoría de las mujeres se detecta en etapas avanzadas (III/IV) a diferencia de Estados Unidos donde es detectado en etapas tempranas (3).

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que se puede clasificar de acuerdo a su grado y tipo histológico. La mayoría de los tumores tiene su origen en la unidad ducto-lobulillar (5). La clasificación actual de la OMS reconoce 17 tipos histológicos de tumor (6). El tipo histológico más frecuente es el carcinoma ductal invasivo, el cual es reportado en varias series con un porcentaje del 50 al 80% del total los tumores, el siguiente en frecuencia corresponde a los tumores mixtos que en conjunto llegan a ser hasta el 25%. (5). Una clasificación que orienta mejor hacia el pronóstico y la elección de tratamiento más específico es a través de marcadores moleculares, de forma que los tumores se pueden subclasificar con base a lo siguiente:

- Receptores de progestágenos y estrógenos: Fueron los primeros marcadores reconocidos en cáncer de mama y se les considera de buen pronóstico (6). Los estrógenos son esenciales para la proliferación y diferenciación de las células epiteliales de la mama (8).
- HER2/Neu: El cual es un receptor de un factor de crecimiento epitelial que pertenece a la familia de Her/ErbB2/Neu la cual incluye también a HER1, HER3 y HER4. Estas son proteínas transmembranales con una acción de tirosina cinasa. La transducción de señales a través del receptor fosforila una serie de sustratos para la activación de vías importantes en el desarrollo y la progresión del cáncer. El HER2/Neu puede formar heterodímeros con cualquiera de los otros componentes de la familia, se rompe por una metaloproteasa y libera el fragmento p95 que puede ser detectado en sangre. La amplificación de HER2/Neu está asociada a un mal pronóstico (7), además está implicado en una función anormal de la célula favoreciendo la transformación epitelio mesénquima y la metástasis a nivel de Sistema Nervioso Central (SNC) (8).
- Queratina 5, 17, laminina gama-2: componentes de la membrana basal (6).
- Ki67: Es una proteína nuclear que se correlaciona con el grado de mitosis que existe en el tumor, lo cual está asociado con la sobrevida en mujeres con ganglios negativos (2).
- EGFR: Receptor de factor de crecimiento endotelial (2).

Estos marcadores moleculares se usan para dividir el cáncer de mama en los siguientes subtipos:

- Luminal A: Es positivo para receptores de estrógeno y progesterona, negativo para HER2/neu y presenta nivel bajo de Ki-67. Este subtipo es el más frecuente y representa el 50-60% del cáncer de mama. Usualmente son de bajo grado, tienen un buen pronóstico con un riesgo de recurrencia de 27.8%. El tratamiento específico es con inhibidores de aromatasa y moduladores del receptor de estrógeno (6, 9-10).
- Luminal B: Son positivos para receptores de estrógeno, progesterona y HER2/neu, tienen una mayor expresión de Ki67. Son el 10-20% de los tumores. Tienden a ser de mayor grado, tener un peor pronóstico, una mayor tasa de recurrencia y un menor tiempo libre de enfermedad que el subtipo Lumina A (6,9-10)
- HER2/neu positivos: Son negativos para receptores de estrógenos, progesterona y positivos para HER2/neu. Tienen una baja expresión de los genes luminales sin embargo, tampoco hay expresión de genes basales. En diferentes series llegan a ser del 20 hasta el 50% del cáncer de mama, sin embargo en otros estudios se reportan del 10-15%(10). 75% son de alto grado y el 40% tienen mutación de p53, con un curso de mal pronóstico(6, 9-10)
- Similar al Basal: Son negativos para receptores de estrógenos, progesterona y HER2/Neu, son positivos para citoqueratina 5/6 y para EGFR. Expresan genes que usualmente se encuentran en células mioepiteliales. Representan el 10-20% de los tumores. Clínicamente suelen presentarse en mujeres jóvenes, los tumores tienden a ser grandes, frecuentemente son de alto grado y tienen ganglios positivos. La recurrencia tiende a ser agresiva con metástasis. (6, 9, 10)

Hay dos subtipos que se han introducido recientemente:

- Mama normal: Es triple negativo pero no expresa citoqueratina 5/6 y es negativo para EGFR. Expresan genes que se encuentran en células adiposas. Tiene un pronóstico intermedio entre luminal y basal. Son el 5-10% de los tumores y algunos autores piensan que se trata de un artefacto. (10)
- Claudin-low: Tiene poca expresión de moléculas de adhesión como Claudina 3, 4, 7, cigulina, oculina y E-caderina. Además la expresión de HER2/Neu está disminuida, así como la de los genes basales. Expresan genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima. Son tumores de muy mal pronóstico. Y pueden llegar a ser el 12-14% (10).

Como se mencionó anteriormente, los avances del conocimiento del cáncer a nivel molecular han ayudado a estratificar el cáncer de mama para dar un tratamiento y pronóstico más específico, sin embargo, muchos de los tumores presentan recurrencia, algunos subtipos tienen muy mal pronóstico y no se tiene un tratamiento adecuado. Dentro de éste último grupo hallamos al cáncer de mama con características similares al basal, los cuales siempre son triple negativo (11). Las mujeres portadoras de mutaciones germinales o somáticas en *BRCA1* usualmente tienen éste subtipo de tumor (11). Dentro del cáncer de mama triple negativo puede haber una gran heterogeneidad en la respuesta al tratamiento (8). Los nuevos tratamientos que se encuentran en

estudio para este subtipo de cáncer incluyen los inhibidores de PARP, de ERGF, de angiogénesis, y los agonistas de TRAIL (8), pero tienen una respuesta moderada.

Otro subtipo con mal pronóstico es el HER2/neu. En un estudio realizado por Mi-Jung Kim *et al*, se encontró que los tumores que sobreexpresaban HER2/neu presentan mayor grado histológico a nivel de ganglios y mayor frecuencia de metástasis que los tumores triple negativos (13). Existen algunos tratamientos específicos contra HER2/neu como es el de trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a HER2/neu bloqueando su acción. Los primeros estudios con trastuzumab como tratamiento adyuvante mostraron efectividad contra este tipo de tumores con un 50% de mejoría en el tiempo libre de enfermedad y 30% de mayor supervivencia, sin embargo, en estudios clínicos más recientes y mejor controlados no se ha encontrado una respuesta tan buena (12). En el reporte de los avances del estudio HERA sobre la utilidad del trastuzumab en el cáncer de mama en tumores con amplificación HER2/neu (12), la mejoría en el tiempo libre de enfermedad y de supervivencia es menor a la estimada anteriormente cuando se compara con un grupo control, además el costo que conlleva el tratamiento tal vez no refleje los beneficios esperados (12), por lo que un análisis a más tiempo y más completo es necesario.

Para la búsqueda de nuevos tratamientos en el cáncer de mama es importante la comprensión de su origen, el comportamiento biológico del mismo y qué células hay que atacar para evitar la recurrencia del tumor. Una teoría sobre el origen del cáncer que ha tomado importancia en los últimos años es sobre las células madre del cáncer. En las últimas décadas se determinó que todos los tejidos poseen un tipo de células con la capacidad de generar diferentes tipos celulares, es decir, células pluripotenciales a las que se les conoce como células madre; estas células se encargan de la renovación del tejido y de su reparación (14-15). Las células madre tienen una localización especial o nicho que posee características particulares para el mantenimiento de las células madre (15). Por otro lado las células madre son las únicas que permanecen en el tejido el tiempo suficiente como para sufrir mutaciones y una transformación maligna (14)(15).

Las células madre transformadas, conocidas como células madre del cáncer pueden desarrollar tumores al transferirse a ratones inmunodeficientes y mantener el crecimiento tumoral (14).

Se ha realizado un enorme esfuerzo para identificar a las células madre, la célula mejor caracterizada es la hematopoyética cuyo estudio se inició hace 30 años (15). Las células madre presentan una expresión diferencial de marcadores de superficie (15) y son solo una pequeña fracción del tejido normal (3-25%) (15). En el caso de las células madre de la glándula mamaria inicialmente se identificaron por patología dos tipos celulares con aparente capacidad pluripotencial: unas células pálidas pequeñas a nivel basal en el epitelio y unas células no diferenciadas grandes y pálidas entre la zona basal y luminal (16). Gudjonsson y colaboradores identificaron una célula bipotencial la cual era positiva para el antígeno específico epitelial (ESA) y negativo para sialomucina (MUC-1) capaz de producir células luminales y mioepiteliales, éstas además expresaban queratina 9 y se encontraban en posición basal (16). Posteriormente Dontu y colaboradores aislaron células con capacidad de autorrenovación en cultivos, éstas células eran no adherentes y crecían en agrupamientos esféricos a los cuales se les llamó mamoesferas, al colocarlas en tejido mamario eran capaces de diferenciarse a tres linajes celulares: mioepitelial,

luminal y alveolar (16). Estudios posteriores demostraron que hay una jerarquía en el epitelio de la glándula mamaria que se origina en células madre receptor de estrógeno negativas, las cuales se dividen y dan una célula madre receptor estrógenos positiva, éstas a su vez se dividen más rápido que las primeras originando varios tipos celulares (16).

Para la identificación de células madre del cáncer Al-Hajj y colaboradores informaron de un patrón de expresión de células iniciadoras del cáncer, es decir, células capaces de originar tumores en ratones inmunodeficientes y dar la heterogeneidad de las células en un tumor (16). El patrón determinado fue la relación de las proteínas $CD44^+/CD24^{-/low}$ (16).

CD44 es una glicoproteína de adherencia que une a la superficie de la célula con el ácido hialurónico (17), algunas de sus funciones son adhesión célula-célula, célula-matriz, migración celular, proliferación y homing de linfocitos (18). Se ha usado como marcador de células madre de cáncer en otros tipos de tumores como próstata, ovario, colon, páncreas, carcinomas escamosos de cabeza y cuello, y algunos sarcomas (19). El gen *CD44* tiene 20 exones de los cuales 9 tienen splicing alternativo, además la proteína sufre modificaciones postraduccionales de glicosilación, por lo que su peso molecular generalmente se encuentra entre 80-200kDa. La forma más pequeña, también llamada estándar (CD44s), no contiene ninguno de los exones que sufren splicing alternativo por lo que su peso molecular teórico es de 36kDa, sin embargo usualmente sufre una extensa glicosilación y suele correr en 80-90kDa. El alargamiento de CD44 por splicing alternativo ocurre en la región tallo de la molécula, las cuales resultan en formas variantes (CD44v)(20). En tumores malignos hay una mayor expresión de CD44v y CD44s comparado con su contraparte benigna en muchos tipos de cáncer (20), sin embargo, en otros estudios en los cuales, hay una expresión igual e incluso menor en el tumor maligno en la misma neoplasia. En la mayoría de reportes se reconoce que hay una mayor expresión de CD44v al progresar el tumor a metástasis, al contrario en un estudio de cáncer de colon los tumores metastásicos tuvieron una menor expresión de CD44 (20). Dentro de las diferentes CD44v, la CD44v6 pueden estar relacionada con tumores muy agresivos (21). Las discrepancias reportadas se han tratado de explicar con relación a las isoformas de CD44s y v, y la glicosilación de la mismas (20).

CD24 es una proteína tipo mucina glicosilada, la cual está unida a la membrana celular por una molécula de glicosil-fosfatidil-inositol. Se encuentra implicada en la regulación de la proliferación celular y la interacción célula-célula. (21)

El patrón de $CD44^+/CD24^{low/-}$ se encuentra en una subpoblación de células dentro del tumor de mama, estas células son capaces de generar un tumor cuando son implantadas en ratones inmunológicamente deprimidos (21).

Dentro de los estudios de la expresión de estos marcadores de CSC y pronóstico se encuentran los siguientes:

En un estudio realizado por Abraham y colaboradores, el porcentaje de células positivas para $CD44^+/CD24^{-/low}$ en un tejido tumoral no se relacionaron con el pronóstico del paciente (14). Sin embargo, en otros trabajos ocurre lo contrario: En el estudio de Aulmann y colaboradores los marcadores $CD44^+/CD24^{-/low}$ se asociaron con la presencia de metástasis óseas (18) y, Balic y colaboradores, demostraron que las metástasis en médula ósea también presentan un incremento de expresión de éstos marcadores, los cuales están presentes en pacientes con mal pronóstico. El

trabajo de Fillmore encontró que las células que expresan CD44+/CD24-/ESA+ en cultivo son resistentes a la quimioterapia (23). En algunos estudios se demostró una relación positiva entre los marcadores de células madre con la transformación epitelio mesénquima y la presencia de células tumorales circulantes (24,19) así como la progresión del tumor hacia metástasis (25). Los estudios en cuanto la relación que existe entre CD44/CD24 y CD44 con el pronóstico en cáncer se pueden observar en la siguiente tabla.

Estudio	CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} A favor.	CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} En contra.
Mylona E, et al. (20)		CD44-/CD24+ asociado con pobre pronóstico
Abraham BK, et al. (14)		La presencia CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} de no se asocia a peor sobrevida
Aulmann, et al. (18)	CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} se asocia a metástasis óseas.	
Fillmore, et al.(23)	Los tumores CD44+/CD24-/ESA+ resistencia a la quimioterapia.	
Honeth G, et al.(21)	CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} Se relaciona con pobre pronóstico.	
Afify A, et al.(21)	CD44v6 se asocia con tumores muy agresivos.	

Otra proteína que se expresa en células madre de cáncer de mama, hematopoyéticas y de sistema nervioso central es la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH1) (17). Las ALDH son una familia de enzimas citosólicas encargadas de la oxidación de aldehídos, principalmente de la oxidación de retinol a ácido retinoico importante para la diferenciación inicial de las células madre. En varios tipos de cáncer hay un incremento de la actividad de ALDH (26). La expresión de ALDH1 crea resistencia a la quimioterapia alquilante (27). Muchos grupos han encontrado un pronóstico pobre en los tumores que expresan ALDH1, principalmente en próstata y mama; sin embargo en otros estudios, en cánceres de páncreas, pulmón, hepatocelular y de colon se encontró que la pérdida de la expresión de ALDH1 se asocia a una menor sobrevida y metástasis. (28) Los estudios en cuanto a la relación de ALDH1 con el pronóstico y progresión del cáncer se pueden observar en la siguiente tabla:

Estudio	ALDH1 a Favor	ALDH1 en contra
Ginestier C, et al (26)	La expresión de ALDH1 se asocia a peor pronóstico	
Deng S, et al. (27)	La expresión de ALDH1 se asocia a resistencia a la quimioterapia	
Park SY, et al (28)	La expresión de ALDH1 se asocia a mayor grado, amplificación de HER2/Neu y de Ki67.	
Hessman, C. (28)		En cáncer de páncreas, pulmón, hepatocelular y cáncer de colon se encontró que la pérdida de la expresión de ALDH1 se asocia a una menor sobrevida y metástasis.

Recientemente se propuso una correlación hipotética por Schmitt y colaboradores del subtipo molecular con la expresión de CD44/CD24 y ALDH1: en donde los subtipos moleculares que tienen una mayor expresión de CD44 con una menor expresión de CD24 son el claudin-low y el tipo similar al basal; el que presenta una mayor expresión de ALDH1 es el HER2Neu, y el que tiene una menor expresión de CD44 con mayor expresión de CD24 es el luminal A. (21). (21)

Como se mencionó anteriormente, las células madre se encuentran en un microambiente específico o nicho (16). Estos nichos protegen a la célula madre de su expansión inapropiada, regulan su función y mantienen su capacidad pluripotencial (29-30). Hay evidencia de que estos nichos se encuentran en regiones con baja presión de oxígeno, con un mecanismo de reducción de daño al DNA por estrés oxidativo (31-32). Este ambiente de hipoxia cambia la expresión genética modificando la diferenciación, la proliferación y la capacidad de migración de las células (31,22). El principal mediador del cambio de la expresión genética es el factor HIF, el cual presenta dos subunidades variables, HIF1alfa y HIF2alfa, y una subunidad constante HIF1beta (31). En condiciones de no hipoxia HIFalfa es hidroxilado en los residuos prolina, lo cual permite su unión al complejo pVHL que induce su degradación por el proteosoma (31). En caso de hipoxia, HIF alfa no es ni degradado ni hidroxilado, por lo que se une a HIF1 beta, se translocan al núcleo donde forman un complejo con p300/CBP, se unen a una secuencia de DNA llamada elemento de respuesta a hipoxia y activan la transcripción de más de 150 genes que regulan el metabolismo celular, la supervivencia, la motilidad, la integridad de la membrana y la angiogénesis (31).

La importancia de HIF1 alfa y 2 alfa en el mantenimiento de las células madre se evidencia en un estudio que utilizó embriones de ratones KO para estas subunidades, los cuales presentan una menor cantidad de células madre en el saco vitelino y muerte días después (32).

Se ha observado que en un ambiente de hipoxia los tumores tienden a ser más agresivos (33) y genera la prevalencia de un fenotipo de células madre en el tejido, como es el caso del neuroblastoma, por lo que la hipoxia puede estar implicada en el mantenimiento de las células madre del cáncer (33). La hipoxia está implicada en la progresión, invasión y metástasis del cáncer debido a que, junto con el estrés oxidativo inducen la capacidad de movilización y migración de las células madre del cáncer a tejidos con baja tensión de oxígeno a través de factor 1 derivado de estroma (SDF1) (34). La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es potenciada por la formación de vasos sanguíneos aberrantes que crean un ambiente de hipoperfusión-reperfusión, algunos autores incluso sugieren que la quimioterapia puede contribuir a la migración de células madre de cáncer al aumentar la producción de radicales libres (34).

Algunos de los genes que se inducen por HIF alfa han tomado importancia. Dentro de estos encontramos los genes *Oct4*, *Nanog* y *Sox2* como blancos específicos de HIF2 alfa (32). Estos genes están estrechamente implicados en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre (32). Takahashi y Yamanaka demostraron que la expresión directa de cuatro transgenes en fibroblastos provocan que la célula se transforme a una con características de célula madre a las cuales llamaron IPs (células inducidas pluripotenciales), los transgenes expresados fueron *KLF4*, *Sox2*, *Oct4*, and *c-Myc* (31)(35). *Oct4* también se observó sobreexpresado en algunos cánceres como el renal de células claras, se piensa que contribuye al cáncer con el mantenimiento de las células madre del cáncer y su proliferación (32-37).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es el más frecuente en mujeres. A pesar de los avances de los últimos años, más de una quinta parte de las mujeres va a fallecer a causa de éste. Ciertos subtipos moleculares presentan un mal pronóstico y carecen de tratamiento específico y/o efectivo, por lo que es importante encontrar nuevos blancos terapéuticos. Las células madre del cáncer se han propuesto como las iniciadoras del tumor y las culpables de las metástasis. La relación de algunos marcadores de células madre con el subtipo molecular y el tipo histopatológico han sido poco estudiado. Por lo que es importante determinar si existe alguna relación entre los marcadores CD44 y ALDH1 con el tipo histológico y subtipo molecular en mujeres con cáncer de mama para en un futuro buscar blancos terapéuticos relacionados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar del avance en el tratamiento del cáncer de mama en los últimos años, aun es inadecuado para algunos subtipos moleculares. Algunos cánceres tratados exitosamente presentan recurrencia del tumor, por lo que la evaluación de nuevos blancos terapéuticos resulta relevante. Las células madre del cáncer pueden ser las iniciadoras del tumor y puede haber factores importantes en el mantenimiento de las mismas. Al conocer la importancia que presentan estos datos en los subtipos histológicos de peor pronóstico podremos orientar el tratamiento. Por lo anterior nos planteamos la siguiente pregunta:

¿Existe relación entre la expresión de marcadores de células madre CD44 y ALDH1 con el tipo histológico y el subtipo molecular en muestras de tejido con cáncer de mama?

HIPÓTESIS

Se encontrará una relación positiva entre el grado de expresión de células CD44 y ALDH1 con el tipo histológico y subtipo molecular de muestras de tejido de cáncer con mama.

OBJETIVOS.

Objetivo general: Relacionar la expresión del marcador CD44 y ALDH1 con el tipo histológico y el subtipo molecular de muestras de tejido con cáncer de mama.

Objetivos específicos:

Recabar los datos del tipo histológico y el subtipo molecular de tejido de cáncer de mama.
Medir la expresión de CD44 y ALDH1 mediante Western Blot con una técnica semicuantitativa en tejidos con cáncer de mama y en tejido sano adyacente.
Determinar las variables y condiciones que hay que introducir o modificar para ampliar la muestra.
Determinar la varianza de los datos obtenidos para calcular el tamaño de muestra.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizará un estudio piloto el cual será observacional, descriptivo y transversal.

Tiempo y espacio

La sede y realización del presente proyecto de investigación se llevará a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular, UIM Genética Humana, Hospital de Pediatría, CMNSXXI, IMSS, México, D.F. De diciembre del 2011 a septiembre del 2012.

Tamaño de muestra

Se tomarán 20 muestras de tejidos con cáncer de mama y de tejido adyacente sano del Banco de tejidos de cáncer de mama del Laboratorio de Infectología del UMAE Hospital de pediatría CMNSXXI. La muestra no es representativa de la población y únicamente se realizará como estudio piloto para introducir las variables y condiciones para amplificar la muestra. En un estudio ampliado, tomando en cuenta que en México viven 57,000,000 de mujeres y la prevalencia del padecimiento de 41.8 por 100,000 mujeres el tamaño de muestra es de 379, con un intervalo de confianza del 95% y rango de error de 5%, con una varianza de 50%.

Variable	Tipo de variable	Definición	Definición operacional	Escala de medición	
Tipo histológico de cáncer de mama	Cualitativa	Características por medio de estudios histopatológicos del tumor.	Reporte histopatológico presente en el expediente clínico	Carcinoma ductal in situ Carcinoma ductal infiltrante Carcinoma lobulillar in situ Carcinoma lobulillar infiltrante Carcinoma tubular puro Carcinoma medular Carcinoma mucinoso Carcinoma neuroendocrino. Carcinoma papilar Carcinoma micropapilar Carcinoma secretorio Carcinoma apócrino Carcinoma metaplásico	Independiente

				<p>Carcinoma rico en lípidos.</p> <p>Carcinoma oncocítico</p> <p>Carcinoma cístico adenoide</p> <p>Carcinoma sebaceo</p> <p>Carcinomas mixtos</p>	
Clasificación por marcadores moleculares	Cualitativa	Determinación de los receptores de estrógenos, progesterona y HER2/Neu por medio de anticuerpos monoclonales en corte histológico del tumor.	Reporte patológico de presencia o ausencia de receptores de estrógenos, progesterona y HER2/Neu en el expediente clínico.	<p>Luminal A</p> <p>Luminal B</p> <p>Triple negativo</p> <p>HER2/Neu+</p>	Independiente.
CD44	Cuantitativa.	Proteína de membrana asociada a metástasis y otros procesos en el cáncer. Marcador de células madre del cáncer.	Proporción de densidad de la banda en un papel de nitrocelulosa medida en pixeles que evidencia la proteína CD44 por medio de Western Blot en comparación con el control (tejido adyacente)	0.5 veces, 2 veces, 3 veces , etc.	Dependiente.
ALDH1	Cuantitativa.	Proteína marcadora de células madre del cáncer de mama.	Proporción de densidad de la banda en un papel de nitrocelulosa medida en pixeles que evidencia la proteína ALDH1 por medio de Western Blot en comparación con el control (tejido adyacente)	0.5 veces, 2 veces, 3 veces ...	Dependiente
Porcentaje de células tumorales en el tejido.	cuantitativa	Proporción de células con características tumorales en el tejido tumoral y adyacente.	Porcentaje de células con características tumorales reportadas por patología.	0-100%	Independiente.

Criterios de inclusión:

Tejido tumoral de pacientes del sexo femenino con diagnóstico de cáncer de mama.

El tejido debe ser fresco o encontrarse congelado y que no haya recibido un tratamiento previo para otro estudio histopatológico.

Tumores que sean clasificados por histopatología y subclasificados molecularmente, y que se cuente con el reporte en el expediente clínico del hospital correspondiente.

Los tejidos tumorales deben de contar con igual o más del 50% de células tumorales

Criterios de exclusión:

Personas que hayan recibido previamente tratamiento con quimioterapia o radioterapia.

Personas con cáncer de mama por recaída del tumor.

Criterios de eliminación:

Que el tejido no se encuentre correctamente almacenado.

Que la muestra sea insuficiente para los estudios de laboratorio necesarios para el trabajo.

ASPECTOS ÉTICOS

El estudio no representa ningún riesgo para el paciente, ya que la muestra se tomará del tumor resecado, lo cual constituye en sí mismo el tratamiento de elección para este tipo de tumores.

No se aplicara ningún cuestionario al paciente, los datos recolectados se tomaran del expediente.

FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD.

El protocolo se realizará con muestras de tejido de cáncer de mama del Banco de tejidos de cáncer de mama del Laboratorio de Infectología del Hospital de Pediatría CMN siglo XXI. Los recursos de laboratorio para extracción de proteínas se encuentran disponibles en el laboratorio de genética del hospital de pediatría del CMN siglo XXI. Los anticuerpos monoclonales para CD44 y ALDH1 serán financiados por los investigadores.

METODOLOGÍA

Biopsias y extracción de proteína

De las 20 muestras determinadas en el estudio 3 se eliminaron debido a tejido insuficiente para realizar los estudios correspondiente. Se usaron 17 muestras de tumores de mama y de tejido adyacente del banco de muestras de tumores de la Unidad de Investigación de Infectología en CMNSXXI conservadas a -70°C.

Se realizó extracción de proteínas en el TissueLyser II de Qiagen por 6-9 minutos con un amortiguador de RIPA (1/10) preparado con un cocktail de antiproteasas complete (Roche) Después de la homogenización se centrifugó 300 g (1600 rpm) durante 10 min a 4°C para recuperar el sobrenadante. La cantidad de proteínas de cada muestra se determinó por el método de Lowry (ver anexo) (49).

Se recolectaron los datos de tipo histopatológico y del subtipo molecular del expediente (el subtipo molecular es determinado por inmuohistoquímica ver anexo). Se obtuvieron los datos de la cuantificación del número de células con características tumorales del reporte de patología.

Electroforesis y Western Blot

Para el análisis de los extractos de proteína se utilizaron 20 ug de cada muestra para hacer una electroforesis desnaturalizante en geles de poli-acrilamida (12%) en un sistema discontinuo (Laemmli). Los geles se corrieron a 150 v durante 90-100 min a temperatura ambiente, después de lo cual fueron teñidos con azul de Coomassie para visualizar las proteínas o transferidos a membranas de PVDF para su análisis por Wb.

Para el análisis de Western Blot se utilizaron 15 ug de cada muestra, se separaron en geles desnaturalizantes y se transfirieron a membranas de PVDF por 1hr, 100 v y 4°C. La inmunodetección se hizo con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD44 (1:2000) y ALDH1 (1:3000). Las bandas de reacción se detectaron por quimioluminiscencia (Millipore) (ver anexo)

Densitometría

Las diferencias de intensidad en las bandas se analizaron por densitometria, las placas del Wb se fotografiaron en un fotodocumentador Chemi doc XRS de Bio Rad, las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Alpha Ease FC 4. Las mediciones se realizaron en tres ocasiones para evitar errores. Se tomó el tejido adyacente como la unidad para comparar una mayor o menor expresión de tumor respecto a este.

Análisis de datos

Se analizaron los datos comparando los valores obtenidos con el tipo histológico y subtipo molecular reportado en el expediente clínico. Se obtuvo la proporción de tumores con mayor expresión de CD44 y ALDH1 por cada subtipo molecular y tipo histopatológico. Se relacionó con lo reportado en la literatura.

RESULTADOS

Se obtuvieron las muestras de tejido tumoral y tejido adyacente correspondiente del Banco de tumores de mama de la Unidad de Investigación en Infectología en el UMAE Hospital de Pediatría CMNS XXI. Todas estas muestras tuvieron igual o más del 50% de células tumorales, mientras que la mayoría de tejidos adyacentes tiene un porcentaje de 0 y solo algunos de 10%. Lo anterior nos comprueba que efectivamente los tejidos utilizados se tratan de tejido tumoral y adyacente. Los datos en la tabla 1 y gráfica correspondiente

Tabla 1. Contenido de células tumorales en el tejido (%)

Muestra	% célula tumorales en Tumor	% células tumorales en adyacente
1CM-010	60	0
1CM-013	70	0
1CM-014	50	0
1CM-016	70	10
1CM-017	70	0
1CM-020	70	10
2CM-006	90	0
2CM-017	50	0
2CM-019	50	10
2CM-027	80	0
3CM-009	95	0
3CM-014	70	0
3CM-016	50	0
3CM-023	98	0
3CM-024	50	0
3CM-030	50	0
DNMMT	60	0

De acuerdo con los datos obtenidos del expediente clínico el tipo histopatológico predominante fue el ductal infiltrante con 8 de 17 tumores, seguido del mixto lobulillar y ductal infiltrante con 3 de 17. Del resto de los tipos histopatológicos se obtuvieron pocas muestras y en de algunos tipos no se consiguieron (tabla 2).

Tabla 2. Tipo histológico de muestras tumorales

Tipo histológico	n=17
Ductal infiltrante	8
Ductal in situ	1
Lobulillar infiltrante	2
Mixto lobulillar y ductal infiltrante	3
Mixto ductal y micropapilar infiltrante	1
Mixto ductal y micropapilar in situ	1
Papilar infiltrante	1

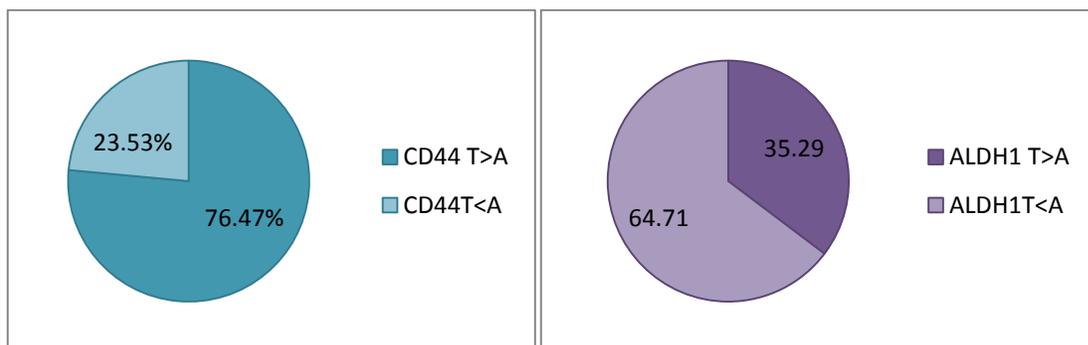
En cuanto al subtipo molecular los datos recolectados en el expediente clínico se corroboraron mediante los datos obtenidos en el laboratorio de la Unidad de Infectología. En nuestra muestra el más frecuente fue el luminal A con 8, seguido del triple negativo con 5, el luminal B con 3 y finalmente el HER2/Neu positivo con únicamente una muestra (tabla 3).

Tabla 3. Subtipo molecular de muestras tumorales

Subtipo molecular	n=17
Luminal A	8
Luminal B	3
HER2/Neu	1
Triple negativo	5

Para analizar estos tejidos, se extrajeron las proteínas totales con el amortiguador RIPA, se cuantificó y realizamos el Western Blot correspondiente (anti CD44 o ALDH1). Se colocaron de manera adyacente el tejido tumoral y el adyacente para facilitar su análisis (Figura 2), como ya se comentó en la metodología, colocamos los anticuerpos primarios (anti-CD44 y ALDH1) en la misma membrana. Analizamos por densitometría la cantidad de expresión proteica de cada uno con relación al tejido adyacente correspondiente (ver tablas 3 y 4). Los resultados mostraron que 13 de los 17 tumores estudiados tienen una mayor expresión de CD44 comparado con el tejido adyacente, esto se muestra en el Figura 1. Solo 4 de los tumores presentó una menor expresión de CD44 en comparación con el tejido adyacente (figura 1).

Figura1. Expresión tumoral de CD44 y ALDH1 en relación a tejido adyacente



En la gráfica de la izquierda se muestra que la mayoría de tumores expresa mayor CD44 en comparación con el adyacente. En la gráfica de la derecha se muestra que la mayoría de tumores expresa menor ALDH1 en comparación con el adyacente

Tabla 3. Expresión tumoral de CD44 en comparación con tejido adyacente

Código de paciente	Expresión tumoral de CD44 en comparación con adyacente
3CM023	0.22
3CM024	0.32
2CM017	0.41
1CM010	0.47
3CM009	1.15
2CM019	1.23
1CM020	1.30
1CM013	1.36
3CM030	1.41
DNMM	1.58
1CM017	1.62
2CM006	1.88
3CM016	4.21
3CM014	4.99
2CM027	11.49
1CM014	12.38
1CM016	17.28

Resultados de Western Blot, el cual fue analizado por densitometría. Un valor menor a 1 significa que la expresión del tumor es menor en relación al tejido adyacente, un valor mayor a 1 significa que la expresión del tumor es mayor a la del tejido adyacentes La línea roja separa los tejidos con menor y mayor expresión de CD44

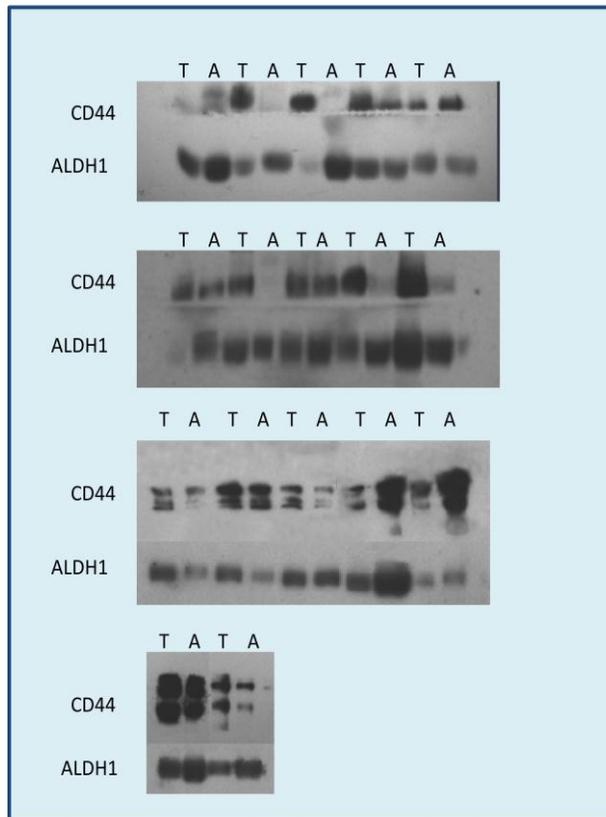
En cuanto a ALDH1 11 de los tumores presentaron menor expresión en comparación con el tejido adyacente, mientras que 6 presentaron mayor expresión del tumor en comparación con el adyacente. Esto se muestra en la figura 1. Se calculó la varianza de los datos obtenidos para ALDH1 y CD44 encontrando que esta corresponde a 40.06

Tabla 4. Expresión tumoral de ALDH1 en comparación con tejido adyacente

Código de paciente	Expresión tumoral de ALDH1 en comparación con adyacente
1CM016	0.10
2CM019	0.19
3CM023	0.42
1CM014	0.48
1CM010	0.58
3CM014	0.58
3CM024	0.68
DNMM	0.74
3CM009	0.76
1CM020	0.78
3CM030	0.84
2CM017	1.19
2CM027	1.48
3CM016	1.65
2CM006	1.67
1CM017	1.98
1CM013	2.93

Resultados de Western Blot, el cual fue analizado por densitometría. Un valor menor a 1 significa que la expresión del tumor es menor en relación al tejido adyacente, un valor mayor a 1 significa que la expresión del tumor es mayor a la del tejido adyacente. La línea roja separa los tejidos con menor y mayor expresión de ALDH1

Figura 2. Western Blot.



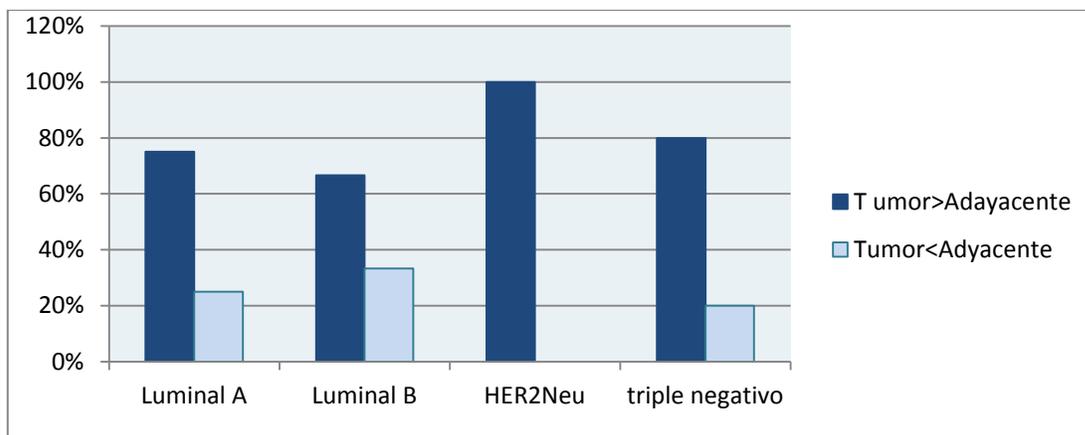
En esta imagen se muestra el Western Blot con anticuerpos para CD44 y para ALDH1. Se observa el tumor (T) junto al su tejido adyacente (A) donde podemos apreciar la diferencia de expresión entre uno y otro.

Del análisis por subtipo molecular se obtuvo la proporción de tumores con mayor (>1) y menor expresión de CD44 (<1) y la media por subtipo molecular (ver tabla 5). De lo anterior se encontró que del Luminal A 6 de los 8 tumores presentó una mayor expresión de CD44. Del luminal B 2 de 3 tumores presentaron mayor expresión de CD44, el único con subtipo molecular HER2Neu presentó mayor expresión de CD44. Por último del triple negativo 4 de 5 de los tumores tuvo mayor expresión de CD44. Esto se analiza en la tabla 5 y la figura 4.

Tabla 5. Expresión de CD44 en relación a subtipo molecular	
Subtipo molecular	Expresión de CD44 (dens)
Luminal A	17.28
	1.88
	1.22
	4.99
	1.37
	1.29
	0.22
	0.47
Luminal B	12.38
	1.62
	0.41
HER2Neu	4.21
Triple negativo	11.49
	1.152
	1.41
	1.58
	0.32

Resultados de Western Blot por subtipo molecular, el cual fue analizado por densitometría. Un valor menor a 1 significa que la expresión del tumor es menor en relación al tejido adyacente, un valor mayor a 1 significa que la expresión del tumor es mayor en relación a la del tejido adyacente. La línea roja separa los tejidos con mayor y menor expresión de CD44

Figura 4. Expresión de CD44 por subtipo molecular



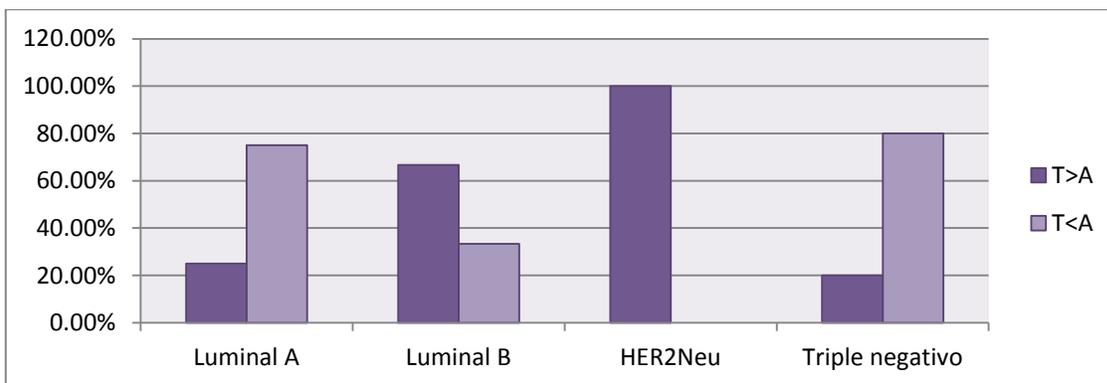
En el gráfico se muestra que en todos los subtipos moleculares hay mayor expresión de CD44 en el tumor en relación al adyacente (columnas azul oscuro), principalmente en el triple negativo y el similar al basal. Es importante enfatizar que de luminal A se representan 8 muestras, de Luminal B 3 muestras, de HER2Neu únicamente 1 muestra y de triple negativo 5 muestras.

En cuanto a ALDH1 también se obtuvo la proporción de tumores con una mayor (>1) y menor (<1). De éste análisis encontramos que en el luminal A el 6 de 8 de los tumores tiene menor expresión del tumor respecto al adyacente. Del luminal B el 1 de 3 tiene menor expresión de ALDH1 en el tumor y el 2 de los éstos tienen mayor expresión de ALDH1. En cuanto al único tumor HER2/Neu tiene una mayor expresión de ALDH1, y en el triple negativo 4 de 5 tienen una menor expresión de ALDH1 en el tumor. Esto se muestra en la tabla 6 y figura 5.

Tabla 6. Expresión de ALDH1 en relación a subtipo molecular	
Subtipo molecular	Expresión de ALDH1 (dens)
Luminal A	0.58
	0.10
	0.42
	0.19
	0.58
	0.79
	1.67
	2.92
Luminal B	0.47
	1.19
	1.98
HER2Neu	1.64
Triple negativo	0.74
	0.76
	0.69
	0.88
	1.48

Resultados de Western Blot por subtipo molecular, el cual fue analizado por densitometría. Un valor menor a 1 significa que la expresión del tumor es menor en relación al tejido adyacente, un valor mayor a 1 significa que la expresión del tumor es mayor en relación a la del tejido adyacente. La línea roja separa los tejidos con menor y mayor expresión de ALDH1

Figura 5. Expresión de ALDH1 por subtipo molecular



En el gráfico se muestra que los tumores luminal A y el triple negativo tiene una menor expresión de ALDH1 respecto al adyacente (columnas morado claro), mientras que el luminal B y HER2Neu tiene una mayor expresión del ALDH1. Es importante enfatizar que de luminal A se representan 8 muestras, de luminal B 3 muestras, de HER2Neu únicamente 1 muestra y de triple negativo 5 muestras.

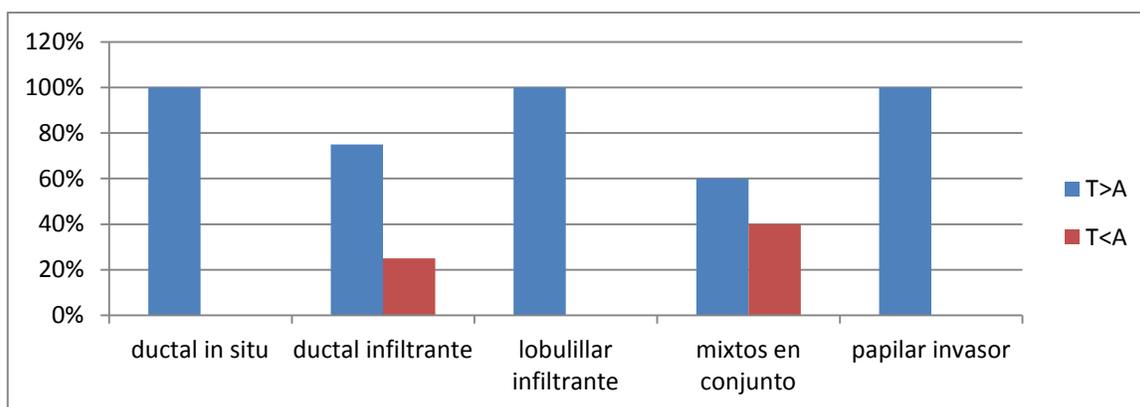
En cuanto al tipo histopatológico encontramos un grupo muy heterogéneo con muy pocos representantes de cada tipo, como se muestra en la tabla 7 y 8. Los datos son difíciles de analizar por lo que se clasificó a todos los tumores con componente mixto en un solo grupo. Se obtuvo la proporción de tumores con mayor expresión de CD44 y también de ALDH1 (>1), así como la proporción de tumores con menor expresión de CD44 y de ALDH1 (<1) (figura 6 y 7) según el tipo histológico reportado. Se observó que el único tumor ductal in situ y el único papilar infiltrante tienen una sobreexpresión de CD44 y una disminución de expresión de ALDH1 (figura 6 y 7). En cuanto al ductal infiltrante, el cual es el grupo más numeroso, 6 sobreexpresan CD44 y 6 tienen una menor expresión de ALDH1. Es interesante ver que el único grupo que mostró una sobreexpresión tanto de ALDH1 y CD44 es el mixto (figura 7 y tabla 8).

Tabla 7. Relación del tipo histopatológico y la expresión de CD44

Tipo histológico	Expresión de CD44 en relación a adyacente
ductal in situ	12.37
ductal infiltrante	17.28
ductal infiltrante	0.41
ductal infiltrante	1.15
ductal infiltrante	4.21
ductal infiltrante	1.29
ductal infiltrante	0.32
ductal infiltrante	1.58
ductal infiltrante	1.23
lobulillar infiltrante	11.49
lobulillar infiltrante	4.99
mixto ductal y lobulillar infiltrante	0.47
mixto micropapilar y ductal infiltrante	1.88
mixto, ductal y lobulillar infiltrante	1.36
mixto, ductal y lobulillar infiltrante	0.22
mixto, micropapilar y ductal in situ	1.62
papilar invasor	1.41

Resultados de Western Blot por subtipo molecular, el cual fue analizado por densitometría. Un valor menor a 1 significa que la expresión del tumor es menor en relación al tejido adyacente, un valor mayor a 1 significa que la expresión del tumor es mayor en relación a la del tejido adyacente.

Figura 6. Relación de tipo histopatológico y expresión de CD44



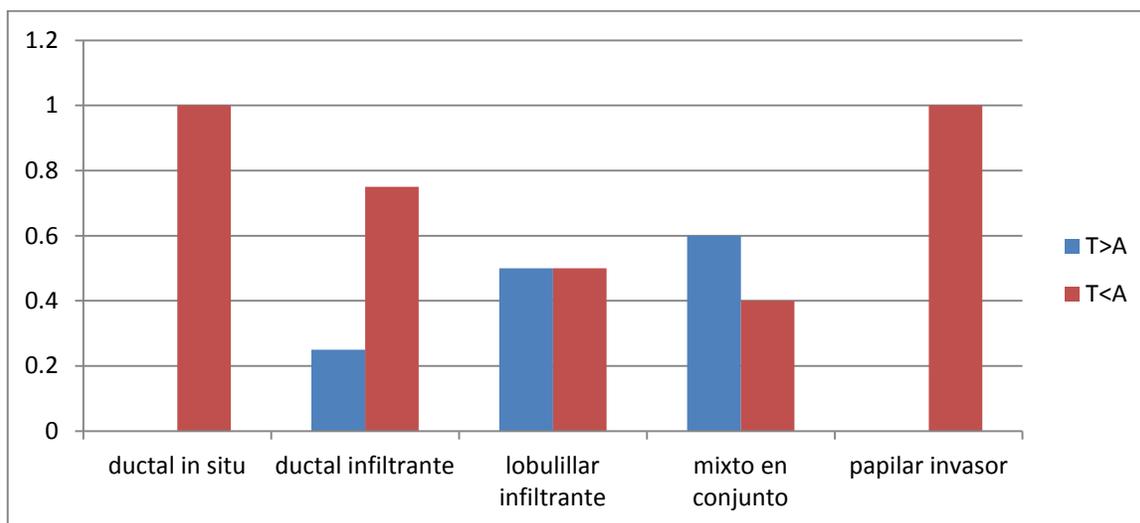
En el gráfico se muestra la relación de la expresión de CD44 con el tipo histológico, encontrando que las columnas azules muestran los tumores con mayor expresión de CD44 en relación al adyacente, mientras que las columnas rojas representan una menor expresión del tumor frente al adyacente. Es importante recalcar que en el grupo ductal insitu y papilar invasor solo se tiene una muestra de cada uno. Los mixtos se colocaron en un solo grupo que representa 3 tipos: el ductal y lobulillar infiltrante, el micropapilar y ductal infiltrante e in situ.

Tabla 8. Relación del tipo histopatológico y la expresión de ALDH1

Tipo histológico	Expresión de ALDH1 en relación a adyacente
ductal in situ	0.48
ductal infiltrante	0.1
ductal infiltrante	1.19
ductal infiltrante	0.76
ductal infiltrante	1.65
ductal infiltrante	0.78
ductal infiltrante	0.69
ductal infiltrante	0.74
ductal infiltrante	0.19
lobulillar infiltrante	1.48
lobulillar infiltrante	0.58
mixto ductal y lobulillar infiltrante	0.58
mixto micropapilar y ductal infiltrante	1.67
mixto, ductal y lobulillar infiltrante	2.93
mixto, ductal y lobulillar infiltrante	0.42
mixto, micropapilar y ductal in situ	1.98
papilar invasor	0.84

Resultados de Western Blot por subtipo molecular, el cual fue analizado por densitometría. Un valor menor a 1 significa que la expresión del tumor es menor en relación al tejido adyacente, un valor mayor a 1 significa que la expresión del tumor es mayor en relación a la del tejido adyacente.

Figura 7. Relación de tipo histológico con expresión de ALDH1



En el gráfico se muestra la relación de la expresión de ALDH1 con el tipo histológico, encontrando que las columnas azules muestran los tumores con mayor expresión de ALDH1 en relación al adyacente, mientras que las columnas rojas representan una menor expresión del tumor frente al adyacente. Es importante recalcar que en el grupo ductal insitu y papilar invasor solo se tiene una muestra de cada uno. Los mixtos se colocaron en un solo grupo que representa 3 tipos: el ductal y lobulillar infiltrante, el micropapilar y ductal infiltrante e in situ. Llama la atención que el único grupo que muestra una mayor expresión de ALDH1 es el mixto.

DISCUSIÓN.

Para determinar si existe relación entre la expresión de CD44 y ALDH1 con el tipo histopatológico y subtipo molecular se analizó inicialmente el comportamiento de la muestra obtenida en cuanto a las frecuencias de tipo histopatológico y subtipo molecular. El tipo histopatológico más frecuente encontrado en nuestra muestra es el ductal infiltrante (8) (ver tabla 1), seguido del mixto lobulillar y ductal infiltrante (3) (ver tabla 1), lo cual correlaciona con lo reportado en la literatura que instala en primer lugar de frecuencia al tipo ductal infiltrante siendo el 50-80%, seguido de los mixtos que se reportan hasta en un 25% en su conjunto. En nuestro estudio los tumores mixtos en conjunto son 7 (ver tabla 1). El subtipo molecular que encontramos más prevalente fue el Luminal A (8) (ver tabla 2), seguido del triple negativo (5) (ver tabla 2). El luminal A, efectivamente es el más frecuente según lo reportado en la literatura y representa 50-60% de los tumores. El triple negativo puede subdividirse en tres tipos: el similar al basal, el claudin low y el mama normal, de tal manera que la frecuencia que ocupan en su conjunto (el claudin low y el similar al basal) puede ser de un 25-30%; la existencia del subtipo mama normal aun es controversial y algunos investigadores han propuesto que es efecto de un artefacto en la toma de muestra, pero puede llegar a ser del 5-10% de los tumores. De tal manera que nuestra muestra se comporta de manera similar a lo reportado en la literatura mundial en cuanto al tipo histopatológico y subtipo molecular, a pesar de ser pequeña debido a que tiene fines de un estudio piloto.

En nuestro estudio encontramos que la mayoría de los tumores tiene una mayor expresión de CD44 (76.46% es decir 13 de 17), sin embargo, el resto de los tumores tiene una expresión menor en comparación con su tejido adyacente (ver Figura 1). Como se mencionó en la introducción el CD44 es una glicoproteína que se une a ácido hialurónico, se ha encontrado como marcador de células madre del cáncer (CSC) en varios tipos de tumor. Se piensa que CD44 está implicado en la oncogénesis, invasión y metástasis al promover la remodelación del citoesqueleto. En varios estudios se ha observado que en diferentes tipos de tumores CD44 esta sobreexpresado en el tumor maligno con relación con su contraparte benigna, sin embargo hay trabajos donde en la misma neoplasia ocurre lo contrario, es decir hay una menor expresión de CD44 en el tumor maligno (18). En mama se ha visto que el aumento de CD44 correlaciona con la progresión del tumor, y tiene una mayor expresión en el tumor maligno en comparación con su contraparte benigna (46), por otro lado otro trabajo encontró que había una menor expresión de CD44 en el tumor en comparación con el tejido adyacente. Es importante recordar, como se mencionó en la introducción, que el CD44 presenta varias isoformas dependiendo del splicing alternativo; la CD44 estándar (CD44s) no tiene ninguno de los 9 exones con splicing alternativo y tiene un peso molecular teórico de 36kDa, pero al ser glicosilado en un gel corre a 80-90KDa. Las isoformas variantes (CD44v) tienen un alargamiento en la región tallo de la molécula. Lo anterior explica la presencia de varias bandas en el Western Blot que pueden corresponder a las múltiples isoformas de CD44 (ver figura 2). Y ésta característica de CD44 también podría esclarecer la discrepancia en cuanto a pronóstico y expresión de CD44 en el tumor en algunos estudios, de hecho algunos trabajos sugieren que la presencia de CD44s (estándar) se asocia a buen pronóstico y menor grado histológico, y que éste se encuentra también expresado en células epiteliales normales; mientras

que la CD44v podría estar involucrado en mal pronóstico y progresión del tumor (38-39), de hecho algunos estudios reportan que CD44v6 se asocia a tumores más agresivos (19). De tal manera que CD44 podría estar actuando en algunas ocasiones como supresor de tumor (esto se ha demostrado en algunos estudios *in vitro*) (42-43) y en otras situaciones estimulando la progresión del tumor, lo cual puede depender de la isoforma estándar o variante, y de la posición y grado de glicosilación de la proteína. Lo anterior explicaría por qué a pesar que la mayoría de nuestros tumores expresan mayor CD44 hay una fracción en la que ocurre lo contrario. Por otra parte existe una gran variación entre el porcentaje de células tumorales en nuestra muestra como se puede observar en la tabla 1, de tal manera que es de importancia determinar cuáles son las células en el cúmulo tumoral que sobreexpresan CD44.

Lo obtenido en cuanto a la expresión de ALDH1 fue completamente opuesto a lo esperado, ya que en la mayoría los tumores (13 de 19) que analizamos se observó una menor expresión de ALDH1 en comparación con el tejido adyacente (ver gráfico 2, tabla 4 y figuras 1, 2, 3 y 4). Como se mencionó el ALDH1 es una enzima implicada en la oxidación de aldehídos, particularmente retinol a ácido retinoico importante para diferenciación inicial de células madre, y también se ha postulado como marcador de CSC. En muchos tipos de tumor, incluyendo mama se ha visto que la sobreexpresión de ALDH1 se asocia a peor pronóstico, pero en dos trabajos de cáncer de colon y de cabeza y cuello se encontró que la pérdida de ALDH1 se relaciona con metástasis (28) En un estudio de Ginestier y cols se demostró que ALDH1 es un marcador de células madre de mama normales, de células madre del cáncer (27), además de células estromales (44). Sin embargo, no se encontraron estudios que comparen el tumor contra tejido adyacente o con tumor benigno del mismo tejido. El hecho de que algunos tumores epiteliales pierdan ALDH1 en fases tardías puede estar hablando que la disminución o pérdida puede estar asociado a progresión a metástasis. Finalmente algunos trabajos han correlacionado su aumento en la expresión con un ambiente de hipoxia (21). De tal manera que este dato deberá ser corroborado con un número mayor de muestras.

El grupo de F. Schmitt en el Instituto de Patología e inmunología de la Universidad de Porto (21) con base en los trabajos realizados en su laboratorio propusieron que los tumores según su subtipo molecular se comportan de la siguiente manera: Los tumores clasificados como Claudin low y similar al basal (triple negativos) tienen una expresión de CD44 mayor con CD24 negativo, mientras que en el subtipo luminal A tiene una mayor expresión de CD24 con menor de CD44, y los que presentan mayor expresión de ALDH1 son los tumores con HER2Neu + (el subtipo HER2Neu y luminal B) (21) (figura 8). Estos datos son apoyados por lo reportado en otros artículos como en Prat *et al* (44) y (45-46).

Figura 8. Comparación de Resultados de expresión de CD44 con lo reportado por Schmitt

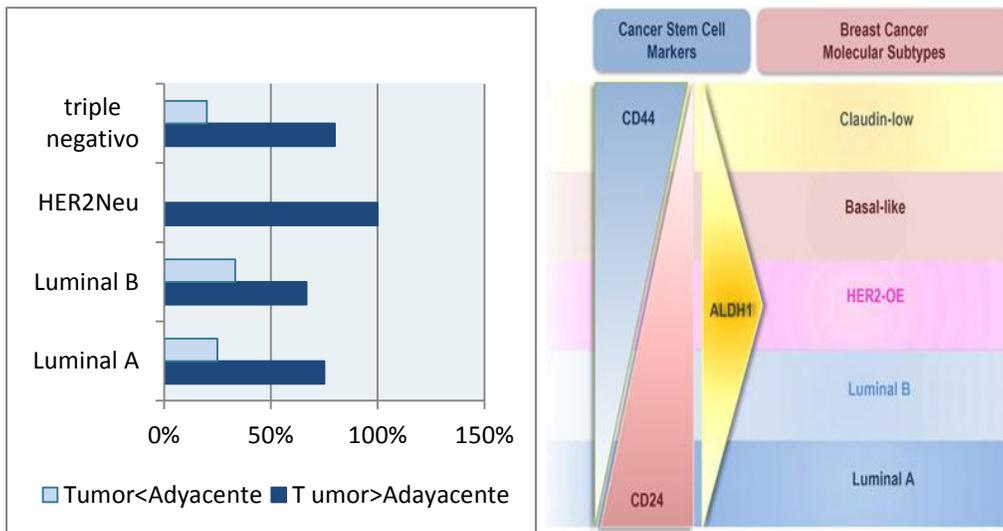


Diagrama tomado del artículo (derecha) "Cancer stem cell markers in breast neoplasias: their relevance and distribution in distinct molecular Subtypes" de la siguiente referencia Virchows Arch (2012) 460:545–553. Gráfico (izquierda) de proporción de tumores que sobreexpresan CD44 (columnas azul oscuro) y las que tienen menor expresión de CD44 (columna azul claro). Es importante decir que el total de tumores luminal A es 8, Luminal B 3, HER2Neu 2 y triple negativo 5.

En nuestro estudio la proporción de tumores/TA que expresa más CD44 es mayor en triple negativo y HER2Neu (Figura 8), (se debe destacar que lo hacen 5 de 6 muestras totales), con respecto a luminal A y luminal B (11 tumores totales de los cuales, dos expresan menos CD44). Aunque la proporción de tumores que sobreexpresan CD44 muestra correlación con el subtipo molecular, para determinar o verificar esto es necesario alcanzar e tamaño de muestra propuesto. Sin embargo podemos tratar de analizar la razón por la cual uno de los tumores triple negativo expresa menor cantidad de CD44 y en promedio tiene una menor expresión de CD44 comparado con los otros tumores puede deberse a que, como se mencionó antes, estos tumores incluyen tres subtipos, dentro de los cuales se proponen que el subtipo mama normal tiene un fenotipo de tejido graso y un pronóstico más benigno con menor expresión de CD44. De tal manera que es importante la caracterización de los tumores triple negativo.

Figura 9. Expresión de ALDH1 en comparación con lo reportado por Schmitt

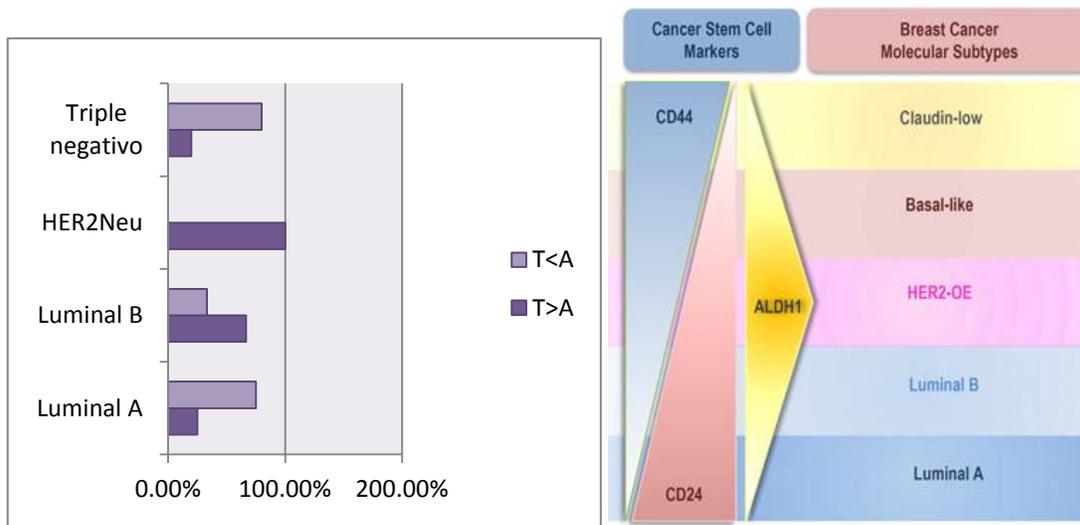


Diagrama tomado del artículo (centro) "Cancer stem cell markers in breast neoplasias: their relevance and distribution in distinct molecular Subtypes" de la siguiente referencia Virchows Arch (2012) 460:545–553. Gráfico (izquierda) de proporción de tumores que sobreexpresan ALDH1 (columnas morado oscuro) y las que tienen menor expresión de ALDH1 (columna lilaclo). Es importante decir que el total de tumores luminal A es 8, Luminal B 3, HER2Neu 2 y triple negativo 5. Grafico (derecha) promedio de expresión de ALDH1 de cada uno de los subtipos moleculares.

En el caso de ALDH1 encontramos que, aunque la mayoría de tumores expresa menos ALDH1; en el subtipo molecular HER2Neu y luminal B predomina la proporción de tumores con mayor expresión ALDH1 (Figura 9 , gráfico izquierdo) lo cual apoya lo sugerido por Schmitt y colaboradores (Figura 9, imagen central), es decir, que los tumores con HER2Neu+ tienen una mayor expresión de ALDH1 (44) y (45), sin embargo nuevamente recalcamos que la muestra es muy pequeña y no se puede llegar a ninguna conclusión.

En cuanto el tipo histopatológico encontrar una relación es difícil principalmente por dos causas, el tamaño de muestra y que tuvimos pocos representantes de cada uno de los tipos. Sin embargo es importante destacar un resultado que llama la atención: los únicos dos tumores con componente micropapilar tiene una mayor expresión tanto de CD44 como de ALDH1 comparado con el tejido adyacente (ver tabla 6 y 7). El carcinoma micropapilar de mama es invasivo, con pobre pronóstico y una alta incidencia de metástasis a ganglios linfáticos. En un estudio se encontró que la expresión de CD44⁺/CD24^{-/low} es mayor en el tipo micropapilar que en el ductal infiltrante (47).

CONCLUSIONES

En la muestra podemos encontrar que tanto la proporción de tumores que sobreexpresan CD44 y ALDH1 parece seguir la tendencia de lo sugerido hipotéticamente por Schmitt. Es decir hay una mayor la proporción de tumores que sobreexpresa CD44 en los triple negativos y HER2Neu; y el único tumor HER2Neu sobreexpresa considerablemente ALDH1. Sin embargo debido a que es un estudio piloto, se debe confirmar esta tendencia con el aumento del tamaño de muestra.

Uno de los objetivos más importantes fue determinar las variables que hay que modificar para que al ampliar la muestra se puedan concluir los resultados que obtuvimos. Como ya se mencionó en la discusión es importante la caracterización de los tumores triple negativos para subclasificarlos como Claudin low, similar al basal o mama normal, sería de beneficio tener el apoyo de al menos dos patólogos (para que tengan un mejor control interno). Es importante utilizar el CD24 como marcador de células madre para establecer el patrón de expresión CD44/CD24 que sirve como marcador de células madre. Utilizar otro método de cuantificación de CD44 y ALDH1 para corroborar lo observado en el Western Blot, como sería la citometría de flujo. Podría meterse anticuerpos específicos para las isoformas CD44v (variable) y la CD44s (estándar), y determinar cuáles son las que se encuentran sobreexpresadas o disminuidas. Se espera finalmente introducir marcadores de hipoxia como HIF1 y HIF2 alfa para determinar su papel en la expresión de CD44 y ALDH1; y marcadores de pluripotencialidad como SOX2 y OCT2.

De tal manera que las variables que se deberán introducir son: la clasificación de los triple negativos como subtipos independientes, un nuevo marcador: el CD24, y las isoformas específicas de CD44. Además de que se propone introducir las variables de hipoxia: HIF1alfa y 2 alfa, y las de pluripotencialidad SOX4 y OCT2. Dentro de las condiciones que hay que modificar es la utilización de otro método para corroborar el resultado como la citometría de flujo, aplicar un control de carga para el western blot, y finalmente el apoyo de al menos dos patólogos experimentados que corroboren el diagnóstico del subtipo molecular y el tipo histopatológico, también se podría aplicar inmunohistoquímica para determinar el tipo de células que sobreexpresa los marcadores de células madre o bien ocupar una muestra más homogénea respecto al porcentaje de células tumorales considerando que debe ser de al menos más del 80% para que tenga mayor validez nuestros datos. Con la varianza de los datos obtenidos la cual es de 40.06 se puede recalcular el tamaño de muestra a 364 biopsias.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) N. Howlader, A. Noone, M. Krapcho, J. Neyman , R. Aminou, *et al.* SEER Cancer Statistics Review 1975-2008, National Cancer Institute. Bethesda.
- (2) M. Barginear, T. Bradley, I. Shapira, D. Budman. Implications of applied research for prognosis and therapy of breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 65 (2008) 223–234
- (3) G. Hortobagyi, J. Garza, K Pritchard, D. Amadori, R Haidinger, *et al.* The global Breast Cancer Burden: Variation in Epidemiology and Survival. *Clinical Breast Cancer*, 6 (2005) 391-401.
- (4) F. Knaul, G Nigencia, R Lozano, H Arreola, A. Langer, *et al.* . Cáncer de mama en México una prioridad apremiante. *Salud Pública de México* , 51 (2009) 2.
- (5) B. Weigelt, F. Geyer , R. Filho. Histological types of breast cancer: how special are they?. *Molecular Oncology* 4(2010) 192-208.
- (6) M. Aaron, M. Gruver, P. Portier, R. Tubbs. *Molecular Pathology of Breast Cancer*. *Arch Pathol Lab Med*. 135 (2011) 544–557.
- (7) W. Dean-Colomb, F. Esteva. Her2-positive breast cancer: Herceptin and beyond. *European Journal Of Cancer* 44 (2008) 2806 –2812.
- (8) J. Chen, J. Russo. ER α -negative and triple negative breast cancer: Molecular features and potential therapeutic approaches. *Biochimica et Biophysica Acta* 1796 (2009) 162–175
- (9) J. Del Casar, A. Martín, C. García , M. Corte , A. Alvarez , *et al.* Characterization of breast cancer subtypes by quantitative assessment of biological parameters: Relationship with clinicopathological characteristics, biological features and prognosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 141 (2008) 147–152.
- (10) P. Eroles, A. Bosch, J. Pérez- Fidalgo , A. Lluch . Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer treatment reviews* 38(2012) 698-707.
- (11) C. Oakman, G. Viale, A. Di Leo. Management of triple negative breast cancer. *The Breast* 19 (2010) 312-321.
- (12) C. Skedgel, D. Rayson, T. Younis. The Cost-Utility of Sequential Adjuvant Trastuzumab in Women with Her2/Neu-Positive Breast Cancer: An Analysis Based On Updated Results from the HERA Trial. *Value In Health* Volume 12 (2009) 5.
- (13) M. Kim, J. Ro, S. Ahn, H. Kim, S. Kim. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Human Pathology* 37(2006) 1217– 1226
- (14) M. Alison, M. Lovell, N. Direkze, N. Wright, R. Poulson. Stem cell plasticity and tumour formation. *European Journal Of Cancer* 42 (2006) 1247–1256.

- (15) I. Mackenzie. Stem cell properties and epithelial malignancies. *European Journal Of Cancer* 42 (2006) 1204–1212.
- (16) D. Ponti, N. Zaffaroni, C. Capelli, M. Daidone. Breast cancer stem cells: An overview. *European Journal Of Cancer* 42 (2006) 1204-1212.
- (17) M. Kakarala, M. Wicha. Implications of the Cancer Stem-Cell Hypothesis for Breast Cancer Prevention and Therapy. *Journal of Clinical Oncology* 26 (2008) 2813–2820.
- (18) P. Auvinen, R. Tammi, M. Tammi, R. Johansson, V. Kosma. Expression of CD44s, CD44v3 and CD44v6 in benign and malignant breast lesions: correlation and colocalitation with hyaluronan. *Histopathology* 47(2005) 420-428.
- (19) H. Kimura, K. Okudela, T. Yazawa, H. Sato, H. Shimoyamada. Cancer stem cell: implications in cancer biology and therapy with special reference to lung cancer. *Lung Cancer* 66(2009) 275-281.
- (20) P. Jacobs, R. Sackstein. CD44 and HCELL: preventing hematogenous metastasis al step 1. *FEBS letters* 585(2011) 3148-3158.
- (21) F. Schmitt, S. Ricardo, A. Viera. Cancer Stem cell markers in breast neoplasia: their relevance and distribution in molecular subtypes. *Vichows Archives* 460(2012) 545-553.
- (22) T. Tanei, K. Morimoto, K. Shimazu, S. Jin Kim, Y. Tanji, *et al.* Association of Breast Cancer Stem Cells Identified by Aldehyde Dehydrogenase 1 Expression with Resistance to Sequential Paclitaxel and Epirubicin-Based Chemotherapy for Breast Cancers. *Clinical Cancer Research* 15(2009) 4234-4241.
- (23) C. Fillmore and C. Kuperwasser. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research* 10(2008) 2.
- (24) G. Barriere, A. Riouallon, J. Renaudie, M. Tartary. Mesenchymal and stemness circulating tumor cells in early breast cancer diagnosis. *BMC Cancer* 23(2012) 114.
- (25) M. LaBarge, O. Petersen, M. Bissell. Of Microenvironments and Mammary Stem Cells. *Development* 3 (2007).
- (26) L. Kang, Y. Guo, X. Zhang, J. Meng, Z. Wang. A positive crossregulation of HER2 and ER-alpha controls ALDH1 positive breast cells. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 127(2011) 262-268.
- (27) S. Chuthaposition, J. Eremin, M. El-Shemmey, O. Eremin. Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells. *Surgical of oncology* 19(2010) 27-32.
- (28) C. Hessman, E. Bubbers, K. Billingsley, D. Herzig, M. Wong. Loss of expression of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 correlates with advanced-stage colorectal cancer. *The American Journal of surgery* 203 (2012) 5, 561-674.
- (29) C. Brisken, S. Duss. Stem Cells and the Stem Cell Niche in the Breast: An Integrated Hormonal and Developmental Perspective. *Development*. 6(2007).
- (30) U. Silvan, A. Díez-Torre, J. Arluzea, R. Andrade, M. Silío, J. Arechaga. Hypoxia and pluripotency in embryonic and embryonal carcinoma stem cell biology. *Differentiation* 78 (2009) 159–168.

- (31) B. Keith, M. Celeste Simon. Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer. *Cell* 129(2007) May 4.
- (32) H. Axelson, E. Fredlund, M. Ovenberger, G. Landberg, S. Pahlman. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells – A mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16 (2005) 554–563.
- (33) Vera-Ramirez. Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells, Biological bases to develop oxidative-based therapies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* xxx (2011) xxx–xxx
- (34) A. Mohyeldin, T. Garzón-Muvdi, A. Quiñones-Hinojosa. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Stem Cell* 7 (2012) August 6.
- (35) Z. Wang, Q. Shi, Z. Wang, Y. Gu, Y. Shen, *et al.* Clinicopathologic correlation of cancer stem cell markers CD44, CD24, VEGF and HIF-1 in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: An immunohistochemistry-based pilot study. *Pathology – Research and Practice* 207 (2011) 505– 513.
- (36) M. Idowu, M. Kmieciak, C. Dumur, R. Burton, M. Grimes, C. Powers, *et al.* CD44+/CD24-/low cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. *Human Pathology* (2011).
- (37) Y. Wang, Y. Liu, S. Malek, P. Zheng, Y. Liu. Targeting HIF1a Eliminates Cancer Stem Cells in Hematological Malignancies. *Cell Stem Cell* 8 (2011) 399–411, April 8.
- (38) J. Hu, K. Qin, Y. Zhang, J. Gong, N. Li, *et al.* Downregulation of transcription factor Oct4 induces an epithelial-to-mesenchymal transition via enhancement of Ca²⁺ influx in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411 (2011) 786–791
- (39) P. Huang, J. Qiu, B. Li, J. Hong, C. Lu. Role of Sox2 and Oct4 in predicting survival of hepatocellular carcinoma patient after hepatectomy. *Clinical Biochemistry* 44 (2011) 582–589
- (40) H. Berner, Z. Suo, B. Risberg, K. Villman, M. Karlsson, J. Nesland. Clinicopathological associations of CD44 mRNA and protein expression in primary breast carcinomas. *Histopathology* 42 (2003)(6) 546-54.
- (41) L. Diaz, X. Zhou, E. Wright, *et al.* CD44 expression is associated with increased survival in node-negative invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research* 11(2005)(9) 3309-14.
- (42) A. Gao, W. Lou, J. Dong, J. Tsaacs. CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Research* 57(1997)(5) 846-9.
- (43) R. Schmits, J. Filmus, N. Gerwin, *et al.* CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood* 90(1997)(6) 2217-33.
- (44) A. Prat, C. Perou. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology* 5(2011) 5-23.
- (45) S. Badve, H. Nakshari. Breast cancer stem cells- beyond semantics. *Lancet oncology* 13(2012) 43-48.

- (46) P. Bhat-Nakshatri, H. Appaiah, C. Ballas. SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44⁺/CD24⁻ phenotype. *BMC Cancer* 10 (2010) 411.
- (47) L. Weidong, L. Fangfang, L. Ting, L. Xinsheng, L. Bingbing, *et al.* The clinicopathological significance of CD44⁺/CD24^{-/low} and CD24⁺ tumor cells in invasive micropapillary carcinoma breast. *Pathology- research and practice* 206(2010) 828-834.
- (48) J. Louderbough, J. Brown, L. Nagle, H. Schroeder. CD44 promotes epithelial mammary gland development and exhibits altered localization during cancer progression. *Genes & Cancer* 2 (2011)(6) 771-781.
- (49) O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farh, J. Randall. The original method. *Journal of bioquimical chemistry* (1951) 193-265.

ANEXO

TissueLyser II de Qiagen: Es un aparato utilizado para la ruptura efectiva de varios tejidos o muestras biológicas. Esto se logra mediante la agitación a alta velocidad de la muestra en un tubo eppendorf con una perla de acero inoxidable.

RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer): Es un buffer que sirve para lisar células y tejidos, de tal manera que se usa para extracción de proteínas. Los componentes del buffer son:

- 50mM Tris
- 150 nM NaCl
- 0.1% SDS
- 0.5% deoxicolato de sodio.
- 1% Triton x 100

Cocktail de antiproteasas complete (Roche): es un inhibidor de proteasa por lo que evita que se degraden las proteínas.

Método de Lowry (47): es un método colorimétrico para cuantificación eficaz de proteínas. Este método se basa en la reactividad del nitrógeno peptídico con el ion de cobre en condiciones alcalinas y la reducción subsiguiente del ácido Folinico a azul de heteropolimolibdeno por la oxidación de ácidos aromáticos mediante el cobre. De tal manera que se mide en un espectrómetro la absorbancia del folin reducido en la muestra. La absorbancia obtenida se compara con la de una curva realizada con concentraciones conocidas de albumina en forma creciente, lo anterior para determinar la concentración de proteína.

El método es el siguiente:

- Se realizó curva con diferentes concentraciones de albumina (0, 10µl, 15µl, 20µl...40µl) y un tubo con 5µl de extracto de proteínas en diferentes tubos.
- Se hace solución C (NaCO₃ 2%, NaOH 0.4%, tartrato 0.16%, CuSO₄ 0.08%).
- Colocó 1ml de solución C a cada uno de los tubos con albumina y extracto de proteína.
- Espera 10 minutos
- Se colocó Folin (disuelto 1:1 con agua bidestilada) 100µl a cada tubo y se esperó 30 minutos.
- Se mide la absorbancia de cada tubo y se realizó una regresión lineal para comprobar que la curva es adecuada.
- Se identifica la cantidad de proteína del extracto de proteínas en relación a su posición en la curva.

Western Blot: es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada (una mezcla compleja de proteínas, como un extracto tisular). Mediante una

electroforesis en gel se separan las proteínas por su peso molecular. Luego se transfieren a una membrana absorbente (usualmente de nitrocelulosa o PVDF), en dicha membrana se detecta la proteína de interés mediante un anticuerpo específico para ella. La técnica ocupada fue la siguiente:

- Se cargo en un gel de acrilamida-bisacrilamida (gel empacador de 4% y separador de 10%) 15µg de proteína de la muestra de tumor y adyacente.
- Se deja correr el gel una hora a 100mV para separar las proteínas mediante electroforesis.
- Se activa la membrana de nitrocelulosa con metanol (pasa de hidrofóbica a hidrofílica).
- Se realiza la transferencia de proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia por 1hr.
- Se bloqueó la membrana con leche al 5% durante una hora.
- Se incuba la membrana de nitrocelulosa con anticuerpo primario monoclonal de conejo contra CD44 a una concentración de 1:2000 y anticuerpo primario monoclonal de conejo contra ALDH1 a una concentración de 1:3000 con leche al 5%. Se deja 12-15hrs en agitación a temperatura 4-8°C.
- Hacer tres lavados con PBST (solución de fosfatos-Tween) de 15,10 y 10 minutos.
- Se incuba 1hr con anticuerpo secundario a una concentración de 1:5000 con leche al 5%.
- Hacer tres lavados con PBST (solución de fosfatos-Tween) de 15,10 y 10 minutos. Realizar un último lavado de 10 minutos con PBS (solución de fosfatos).

Método de quimioluminiscencia: el anticuerpo secundario puede estar marcado con una enzima, la cual lleva a cabo una reacción química al estar en contacto con el luminol, emitiendo fotones de luz, lo cuales se detectan en una placa de rayos X.

Inmunohistoquímica: Técnica mediante la cual se detecta la presencia de un péptido o proteína en una célula o tejido, utilizando un anticuerpo (monoclonal ó policlonal) específico contra él. Se sigue el siguiente procedimiento:

- Fijación del tejido o las células con paraformaldehido (PFA) 4%.
- Se realizan secciones de 10 a 25 mm de grosor. (en caso de encontrarse en parafina el tejido se desparafina y rehidrata, posteriormente se sigue el procedimiento).
- Inmunoreacción: Para eliminar la actividad de las peroxidases endógenas, el tejido se preincuba en una solución de 0,3% H₂O₂ in metanol durante 20 min (este paso no es necesario en el caso de técnicas de inmunofluorescencia).
 - a) Lavar 2x10 min en tampón fosfato salino (PBS) 0,1M a pH 7,4 conteniendo 0,25% Triton(PBST).
 - b) Preincubar durante 30 min con PBST conteniendo 1% de suero de albumina bovina (BSA) a fin de reducir el marcaje inespecífico.
 - c) Incubar durante una noche a 4°C con el anticuerpo primario
 - d) Lavar las secciones con PBST 2x10min.
 - e) Incubar las secciones durante 1hora en el anticuerpo secundario (biotinilado, unido a peroxidasa o a fluorescencia) a temperatura ambiente.

- f) Lavar 2x10 min con PBS.
- g) Incubar las secciones en el complejo ABC durante 1 hora a temperatura ambiente.
- h) Lavar 1x10 min en PBST.
- i) Lavar 1x10min con tampón Tris-HCl 0,1M pH. 7,2.
- j) Incubar las secciones en una solución de 3,3'-diaminobezidina tetrahydrochloride (DAB) al 0,05% en tampón Tris-HCl conteniendo 0,025% de H₂O₂ durante 5 a 10 min.
- 5-Controles** -Omisión del anticuerpo en cada uno de los pasos. -Sustitución del anticuerpo primario por suero inmune. -Pre-incubación del antígeno con el anticuerpo primario diluido a la concentración a la que se usa en la reacción. Todos los experimentos control tienen que dar como resultado la eliminación del marcaje.

En el caso de HER2/Neu es una proteína de membrana, se utiliza por inmunohistoquímica el HercepTest. Se utiliza una escala de 0-3 para determinar la presencia de marcador donde +2 y +3 son positivos, 0 y +1 son negativos.

En el caso de receptores estrógenos y progestágenos son considerados negativos si la reacción de inmunoperoxidasa en el núcleo es menos de 5 por ciento.