



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN  
GENÉTICA MÉDICA

---

**Uso de citometría de flujo para detectar células tumorales  
circulantes en pacientes con cáncer de mama**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:**

**GENÉTICA MÉDICA**

**PRESENTA**

**SONIA DEL CARMEN CHÁVEZ OCAÑA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA**

Profesora titular curso universitario de Genética Médica  
Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"

Ciudad de México Agosto 2019



DR. EDUARDO LICEAGA



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.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL SERVICIO DE GENÉTICA  
A CARGO DE LA DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA DE EL  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO DR. EDUARDO LICEAGA

## ÍNDICE

	<b>PAGINA</b>
ACTA DE REVISION	----- 2
CARTA DE SESION DE DERECHOS	----- 3
AGRADECIMIENTOS	----- 6
DEDICATORIA	----- 7
GLOSARIO	----- 8
RELACION DE FIGURAS	----- 10
RELACION DE TABLAS	----- 11
RELACION DE GRAFICAS	----- 12
SUMMARY	----- 15
INTRODUCCION	----- 17
ANTECEDENTES	----- 22
JUSTIFICACION	----- 46
PREGUNTA DE INVESTIGACION	----- 47
OBJETIVOS	----- 47
MATERIAL Y METODOS	----- 48
RESULTADOS	----- 53
DISCUSION	----- 60
CONCLUSIONES	----- 63
DISCUSION	----- 64

## **AGRADECIMIENTOS**

*NUNCA CONSIDERES EL ESTUDIO COMO UNA OBLIGACIÓN, SINO COMO  
UNA OPORTUNIDAD PARA PENETRAR EN EL BELLO Y MARAVILLOSO  
MUNDO DEL SABER*

***Albert Einstein***

Agradezco a la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, y al Hospital Juárez de México por el apoyo proporcionado para la realización de esta investigación.

∞

Al Dr. en C. Eleazar Lara Padilla por su sólido compromiso académico, por su respaldo en los tiempos difíciles, por fungir como un tutor responsable y por ser un ser humano excepcional, Gracias Dr. por permitirme ser su alumna.

∞

Al Dr. en C. Gustavo Acosta Altamirano, por su invaluable asesoría en investigación, además porque es una gran persona.

∞

Al M. en C. Billy Verdejo Hernández, por compartir conmigo su vasto conocimiento, por el tiempo que empleo para mi trabajo, por las facilidades que me brinda para trabajar en su laboratorio y sobre todo por su amistad

∞

## DEDICATORIA

A

*Manuel, Daniela, Alonso, Jorge Manuel, Yaya y Yaye  
por su infinita paciencia, amor y comprensión*

## GLOSARIO

- **Células tumorales circulantes**

Proceso de generación de células tumorales que atraviesan la circulación y colonizan los órganos distantes. Reflejan el verdadero potencial metastático de los tumores y se correlacionan con el pronóstico (1).

- **Citoqueratina**

Es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular en particular de células epiteliales (2).

- **Citometría de flujo**

Es una técnica sencilla capaz de proporcionar resultados de forma rápida, gracias a su especificidad es capaz de distinguir entre diferentes poblaciones celulares. Implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz (3).

- **Neoplasia**

Es una alteración de la proliferación o diferenciación celular, que se manifiesta por la formación de una masa o tumor, se conoce comúnmente como cáncer (4).

- **Receptores de estrógenos**

Superfamilia de receptores nucleares que ejercen una gran variedad de efectos sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación de diferentes tejidos (5).

- **Receptores de progesterona**

Receptor esteroideo específico a la progesterona (6).

- **Anticuerpo monoclonal**

Un anticuerpo monoclonal es un Anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida producto de la fusión de un clon tumoral de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática (7).



## INDICE DE FIGURAS

<b>NÚMERO</b>	<b>TITULO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1</b>	<b>Incidencia de cáncer de mama en el mundo</b>	<b>21</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Estructura de los filamentos intermedios</b>	<b>41</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Células tumorales circulantes y el proceso metastásico</b>	<b>42</b>
<b>Figura 4</b>	<b>Adquisición de los datos en controles sanas</b>	<b>54</b>
<b>Figura 5</b>	<b>Adquisición de datos estadio I</b>	<b>55</b>
<b>Figura 6</b>	<b>Adquisición de datos estadio II</b>	<b>55</b>
<b>Figura 7</b>	<b>Adquisición de datos estadio III</b>	<b>56</b>
<b>Figura 8</b>	<b>Adquisición de datos estadio IV</b>	<b>56</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>Carta de consentimiento informado</b>	<b>79</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>NÚMERO</b>	<b>TITULO</b>	<b>PAGINA</b>
Tabla 1	Factores de riesgo para cáncer de mama	20
Tabla 2	Oncogenes relacionados al cáncer mamario	30
Tabla 3	Clasificación TNM	31
Tabla 4	Porcentaje de CK19 según estadio	53
Tabla 5	Niveles promedio de CK19 por grupo	57
Tabla 6	Tabla de comparaciones múltiples CK19	58
Tabla 7	Tabla de comparaciones múltiples BIRADS	59

## INDICE DE GRAFICAS

<b>NÚMERO</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PAGINA</b>
<b>Gráfica 1</b>	<b>Muertes y AVISA de cáncer mamario</b>	<b>26</b>
<b>Gráfica 2</b>	<b>Mortalidad por cáncer mamario y CaCu</b>	<b>28</b>
<b>Gráfica 3</b>	<b>Promedio de muerte de cáncer mamario</b>	<b>29</b>
<b>Gráfica 4</b>	<b>Tipos histológicos en cáncer mamario</b>	<b>33</b>
<b>Gráfica 5</b>	<b>Diferencia de medias según estadio</b>	<b>46</b>

## RESUMEN

### Introducción

En los países con mayor y menor desarrollo del planeta, las tasas de mortalidad por cáncer de mama son de 10.3 y 18.3, respectivamente. Con lo anterior se hace necesario establecer técnicas con alto índice de sensibilidad y especificidad que ayuden en el diagnóstico temprano, indiquen la presencia de recurrencia, y con ello se ayude al mejor pronóstico de las pacientes y no solo la mastografía como se ha utilizado como único método de detección. Desde hace una década existen evidencia de la presencia de células tumorales circulantes (CTC) en pacientes con cáncer de mama, esto principalmente ha sido relacionado a estadios avanzados y con ello a mal pronóstico. Algunos investigadores han reportado su detección desde estadios tempranos, en sangre periférica y en aspirado de médula ósea mediante RT-PCR. Recientemente se ha propuesto la detección de este tipo de células mediante citometría de flujo, lo que haría tener un método rápido y de menor costo, por lo que el propósito de este trabajo fue la búsqueda de CTC en sangre periférica mediante citometría flujo en mujeres sanas y mujeres con diagnóstico de cáncer de mama, usando anticuepos monoclonales y compararlo con los estándares de diagnóstico que es la mastografía y el estudio histopatológico.

**Material y métodos.** Se llevó a cabo un estudio comparativo, prospectivo y transversal. Se obtuvo sangre periférica de 42 pacientes que acudían por primera vez a la clínica de mama de oncología en el Hospital General de México,

Eduardo Liceaga. Las muestras se procesaron y marcaron con un anticuerpo monoclonal (CK19), Las células marcadas se cuantificaron por citometría de flujo en un citómetro Bekton-Dickinson, el porcentaje de células marcadas y se comparó con los resultados de la mastografía y del estudio histopatológico.

**Resultados:** Mediante una prueba de ANOVA de un solo factor se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de células marcadas con CK19 entre la pacientes con tumores benignos y aquellas con tumores malignos, siendo esta diferencia directamente proporcional al estadio de avance de la enfermedad y con la mastografía en los estadios avanzados

**Conclusiones.** Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las pacientes con tumores benignos y las pacientes con cáncer de mama. Esta diferencia se incrementa conforme el estadio clínico es más avanzado, guardando relación con la mastografía entre los estadios avanzados, por lo que la determinación de CK19 puede servir como prueba complementaria en el diagnóstico del cáncer de mama.

**Palabras clave:** *Cáncer de mama, citoqueratina 19, células tumorales circulantes.*

## SUMMARY

### **Background.**

Countries more and less developed of the planet, the mortality rates from breast cancer are 10.3 and 18.3, respectively. With the above it is necessary to establish techniques with high level of sensitivity and specificity that help in the diagnosis early, indicate the presence of recurrence and thereby help the better prognosis of patients and not just mammography as currently almost as the only method of detection has been used. Since a decade ago there are studies which relate the presence of circulating tumor cell (CTC) in patients with breast cancer which mainly have related to advanced stages and thereby to poor prognosis, some recent studies proposed detection from early stages, the purpose of this work is its search in peripheral blood by Cytometer flow using Cytokeratin 19 (CK19). **Material and methods:** prospective, cross-sectional study was carried out, was obtained in peripheral blood of 42 patients of the clinic's breast, for through - flow cytometer - search and mark CTC with an antibody monoclonal (CK19), quantified the percentage of marked cells and compared to mammography and the results obtained in the histopathological study. **Results:** Using a single factorse ANOVA test he found that statistically significant differences exist between patients with benign tumours and those with malignant tumors with the flow cytometer both the mammography, also the differences increase while mayor is the stage. **Conclusions:** Although if there is a significant difference between healthy

patients and patients with breast cancer and this difference increases as the clinical stage is more advanced, it is desirable to increase the sample to establish a differential window between the healthy and the stage I and stage II. Likewise, it is appropriate to increase the number of markers to increase the sensitivity and specificity.

**Key words:** breast cancer, cytokeratine 19, circulating tumor cells.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de la glándula mamaria es la manifestación oncológica más frecuente en mujeres en todo el mundo. En México esta forma de cáncer presenta tasas de mortalidad que van en aumento sin que se conozca con certeza la razón de este incremento. La mortalidad está ligada a los estadios más avanzados de la enfermedad donde se presenta diseminación del cáncer a órganos como pulmón, hígado y hueso, se ha convertido en la primera causa de muerte por cáncer en mujeres y la segunda causa de muerte por todas las enfermedades en mujeres de entre 30 a 54 años. Mundialmente, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad. Este es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que produce la degeneración de las células, con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos. Dichos tumores suelen estar localizados, pero eventualmente pueden diseminarse a otros órganos (metástasis). La incidencia del cáncer se relaciona directamente con la edad, ya que las personas están más tiempo expuestas a factores causales relacionados con esta enfermedad. Los tumores malignos representan aproximadamente 13% de las defunciones mundiales, 7.9 millones de muertes por año, de las cuales más del 72% se registran en países de ingresos bajos y medios. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasara de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, estima que durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones. En el registro del año 1978 el cáncer de mama ocupaba el tercer lugar en



incidencia y mortalidad después del cáncer de cuello uterino y del cáncer de estómago. En el informe correspondiente al año 1991 el cáncer de mama está en segundo lugar, ocupando el primer lugar en mortalidad, y las últimas estadísticas publicadas por el INEGI en 2011, muestran que el cáncer de mama ha pasado a ocupar el primer lugar en incidencia y mortalidad, seguido por el cáncer de cuello uterino y el cáncer gástrico. Según estas mismas estadísticas, el cáncer de mama tiene una tasa de incidencia de 31.82 (100,000) y una tasa cruda por 100,000 de 24.28. El riesgo acumulado de desarrollar cáncer, hasta los 74 años de edad, es de 3,5%, es decir 1 de cada 29 mujeres tiene el riesgo de desarrollar cáncer de mama hasta los 74 años de edad. En el caso de los hombres la proporción es muy baja siendo la relación mujer:hombre de 168:1, o sea, que por cada 168 casos de cáncer de mama en mujeres hay 1 caso de cáncer de mama en hombres.

El panorama epidemiológico de esta patología en la población mexicana se ha transformado en los últimos 50 años y el cáncer mamario ha pasado a ser un problema de salud pública.

Algunos factores de riesgo para el desarrollo de cáncer son el consumo de tabaco y alcohol, la obesidad, las infecciones de transmisión sexual como el VPH y la inactividad física, entre muchos otros. De acuerdo con la OMS, el cáncer podría disminuir casi en una tercera parte del total de casos, si la detección y el tratamiento fueran oportunos. De acuerdo al estudio realizado por la OMS en 2005, es posible prevenir el 30% de los casos de cáncer a través de la disminución de factores de riesgo. Por ello, como resultado de las recomendaciones internacionales, en México se llevan a cabo programas encaminados a prevenir los principales tipos de cáncer, a través de estrategias

de prevención y detección oportuna, dos ejes fundamentales para disminuir la morbilidad y mortalidad por dicho padecimiento.

Los principales factores de riesgo conocidos están asociados a estilos de vida, como la exposición prolongada a estrógenos, patrones reproductivos, etc., siendo difíciles de modificar (Tabla 1).

El cáncer de mama es una de las patologías asociadas al envejecimiento, al retraso en el inicio de la vida reproductiva y a los estilos de vida; además, representa un problema de salud pública, debido al incremento gradual y sostenido de dicha enfermedad, así como al costo de su tratamiento. Según la OMS, a nivel mundial, el cáncer de mama afecta al 16% de la población femenina que padeció algún tipo de cáncer. En 2008, la incidencia de cáncer de mama en nuestro país fue de 7.57 casos por cada 100 mil habitantes, afectando principalmente a las mujeres, quienes presentan una incidencia de 14.63 frente a la de 0.27 de los varones. En este sentido, resulta importante conocer la magnitud de este padecimiento entre la población femenina; por ejemplo, la mayor incidencia se presenta en el Distrito Federal (45.84), seguida por Sinaloa (45.76) y San Luis Potosí (45.20), en contraparte, la incidencia más baja se observa en el estado de México (4.62), Chiapas (4.24) y Tlaxcala (2.96).

TABLA 1 Factores de riesgo para cáncer de mama

Fuente: Rev Invest Clin 2009

Factor	Riesgo	Grupo de alto riesgo
Edad	>10	Mayores edades
Localización geográfica	5	Países desarrollados
Edad de la menarca	3	Menarca antes de 11 años
Edad de la menopausia	2	Menopausia después de 54 años
Edad de primer embarazo a término	3	Primer hijo después de los 35 años
Historia familiar	≥2	Cáncer de mama antes de la menopausia en familiar de 1er. grado
Antecedentes de enfermedades benignas	4-5	Hiperplasia atípica
Cáncer en la otra mama	>4	
Grupo socio-económico	2	Grupos I y II (altos)
Dieta	1.5	Alta ingesta de grasas saturadas
<b>Peso corporal:</b>		
Premenopáusica	0.7	Índice de masa corporal >35
Postmenopáusica	2	Índice de masa corporal >35
Consumo de Alcohol	1.3	Ingesta excesiva
Exposición a radiación ionizante	3	Exposición anormal en mujeres adolescentes
<b>Ingesta de hormonas:</b>		
Contraceptivos Orales	1.24	Uso frecuente
Terapia hormonal de reemplazo	1.35	Uso por más de 10 años
Dietilstilbestrol	2	Uso durante el embarazo

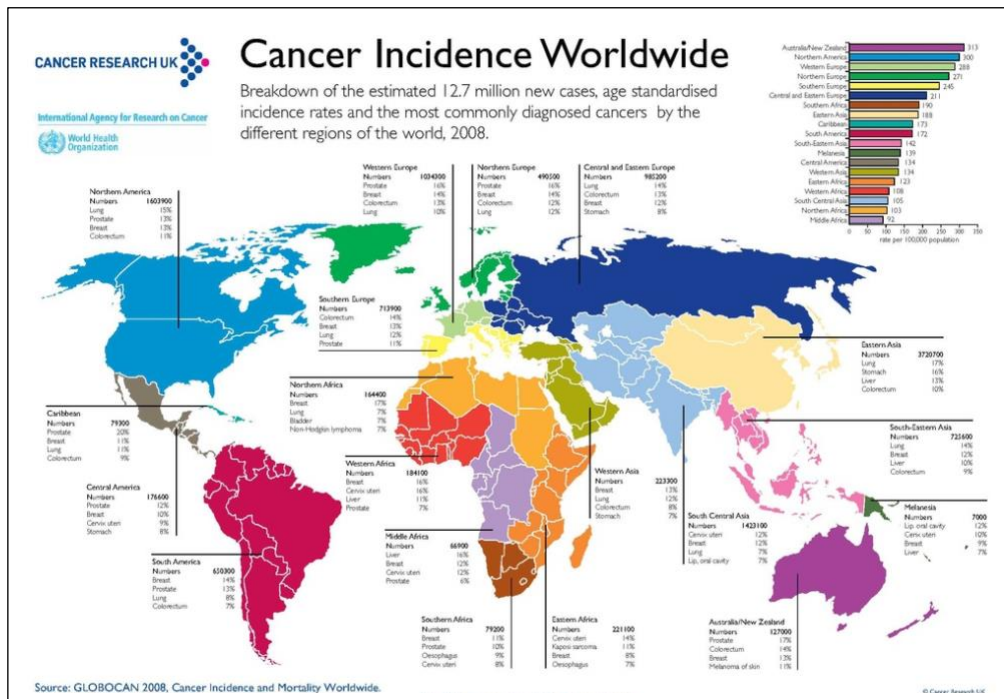
En México, la mayoría de los tumores malignos de mama son diagnosticados en etapa avanzada y las mamografías se han utilizado casi totalmente con fines diagnósticos.

A pesar de ello, el pronóstico es grave y las pacientes que se encuentran en tratamiento, en el 30% de los casos desarrollan metástasis aún con nódulos negativos, resultando en diseminación y muerte.

Por otro lado el estudio de factores relacionados con el pronóstico de la enfermedad ha enfatizado la importancia de las características celulares y demográficas en la supervivencia y mortalidad de las mujeres con cáncer mamario. Clínicamente se toma en consideración la clasificación TNM (Tumor-

Nódulo-Metástasis). Las características celulares notificadas con más frecuencia incluyen la estirpe histológica, otra característica celular es el grado histológico de diferenciación. De manera adicional, se ha señalado la presencia de receptores hormonales y algunos marcadores de proliferación celular como HER2/neu, p53, Bcl-2 entre otros.

En el presente trabajo buscamos encontrar una herramienta que ayude al clínico a tomar decisiones en diagnóstico, tratamiento y pronóstico en pacientes con cáncer de mama mediante la búsqueda de CK19 en sangre periférica.



## ANTECEDENTES GENERALES

### Anatomía de la glándula mamaria

Los lobulillos están formados por diez a cien acinos, cada uno con su conducto excretor denominado conducto terminal. Los acinos están estructurados por un conjunto de células secretoras que producen la secreción láctea y conforman una cavidad a la cual vierten esta secreción, están rodeados

de células mioepiteliales y capilares sanguíneos de singular importancia en el proceso de secreción y eyección de la leche. El sistema de conductos lactíferos que vacía la glándula mamaria es el siguiente: el acino se vacía a través de un conducto terminal, el cual converge con sus congéneres para formar el conducto lobulillar, que recoge la secreción láctea de todos los acinos de un lobulillo. Los conductos lobulillares se reúnen para formar el conducto interlobulillar, que al unirse con otros conductos de éste tipo, forma el conducto lobular o segmentario, de mayor calibre que los anteriores, que se dirige al pezón y antes de llegar a él, bajo la areola mamaria, se dilata formando el seno lactífero, el que se angosta nuevamente al desembocar en el pezón (8,9).

### **Fisiología de la glándula mamaria.**

La glándula mamaria sufre diversos cambios a lo largo de la vida de la mujer; durante los ciclos menstruales, durante el embarazo y la lactancia, básicamente debidos a los diferentes niveles de hormonas femeninas. Por todo ello y por su principal función, la mama necesita un gran aporte de oxígeno, función que lleva a cabo una importante red de vasos sanguíneos que transportan la sangre necesaria a la glándula. Además de estos vasos, la mama tiene una enorme cantidad de vasos linfáticos, los responsables del transporte de la linfa hacia los ganglios linfáticos. La mama esta formada por lóbulos y lobulillos, ductos, tejido conectivo graso, vasos sanguíneos y vasos linfáticos (10).

## **Cáncer de Mama.**

El cáncer de mama es la proliferación acelerada, desordenada y no controlada de las células de los tejidos de la glándula mamaria que desarrollan mutaciones. Las mutaciones ocurren en los genes que actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular (11).

## **Epidemiología.**

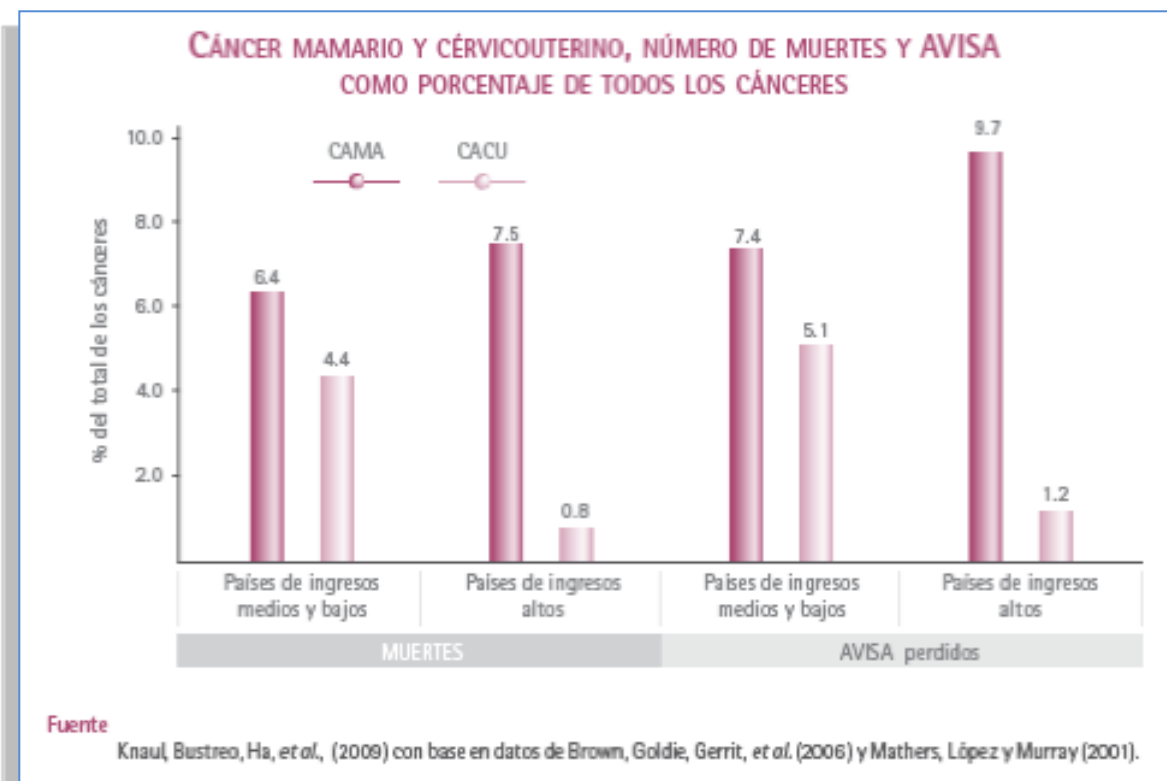
A nivel mundial, el cáncer de mama, es el cáncer más común entre las mujeres, registrándose 411,000 muertes al año a causa de esta enfermedad. Éste es el cáncer más prevalente a nivel mundial: en los últimos cinco años hubo 4.4 millones de mujeres con la enfermedad. En 2009 se presentaron 1.35 millones de nuevos casos, que aumentarán a 1.5 millones en 2010.

El cáncer de mama corresponde al 10.5% de todos los nuevos casos de cánceres, el único tipo de cáncer que registra más casos es el de pulmón (12, 13). El 45% de los casos, así como la mayoría de las muertes por cáncer de mama, se registran en los países en vías de desarrollo, y se estima un aumento en las proporciones tanto de casos como de muertes (14,15,16). De los 1.35 millones de nuevos casos presentados en 2009, 69,000 se ubicaron en los países de ingresos bajos, 415,000 en los países de ingreso medio-bajo y 224,000 en los países de ingreso medio-alto (14,17). La mortalidad por cáncer de mama se concentra en los países en vías de desarrollo debido, en gran medida, a la falta de acceso a la detección temprana y al tratamiento, y muestra una relación clara con el nivel de desarrollo del país. La letalidad medida como la razón de mortalidad y nuevos casos (entre mujeres) es 56%, 44% y 39% entre

los países de ingresos bajos, medio-bajo y medio-alto, respectivamente; comparado con el 24% observado en los países que cuentan con ingresos altos (15,18). Entre los países de ingreso medio-alto, el cáncer de mama es el segundo cáncer más común a nivel poblacional después de cáncer pulmonar, con 11.5% y 11.8% de los nuevos casos presentados en 2009, respectivamente. Entre los países de ingreso medio-bajo es el cuarto cáncer más común, después de pulmón, estómago e hígado, con 13.3%, 11.9% y 10.2% respectivamente. Las cifras para los países de ingresos bajos reflejan una mayor proporción de cánceres relacionados con infecciones, siendo el cáncer de cérvix, con 11.8%, el más común, seguido por hígado con 8.5%, pero aún allí el cáncer de mama corresponde al 7.7% de los casos, y es el tercero más común en términos de nuevos casos. Además, para 2020 se proyecta un aumento de 36%, 28%, y 20% en el número de nuevos casos en los países de ingresos bajos, medio-bajo y medio-alto, comparado con 14% en los países de ingresos altos (19,20). Como proporción de todas las muertes por cáncer entre mujeres, en los países en vías de desarrollo, el cáncer de mama representa el 6.4% de las muertes y el 7.4% del total de los años de vida saludable potencialmente perdidos (AVISA, DALYs por sus siglas en el inglés). Respectivamente, para los países de ingresos altos el cáncer de mama representó el 7.5% de todas las muertes por cáncer y el 9.7% del total de la pérdida de AVISA. Comparado con el cáncer cervicouterino, el cáncer de mama representa una mayor proporción, tanto de las muertes como de la pérdida de años de vida saludables AVISA (19,21). Debido a las muertes tempranas por cáncer de mama, la Organización Mundial de la Salud ha estimado que los años de vida perdidos (AVISA) por cáncer de mama son alrededor de 600,000 en la región de Latinoamérica, cifra tres veces mayor que

los años perdidos por muertes de cáncer pulmonar. En ausencia de intervenciones efectivas en los sistemas de salud para la detección y control del cáncer de mama la cifra aumentará a 900,000 AVISA en el 2020 (19) (Gráfica 1).

Gráfica 1





Estas cifras son aún más impactantes si se considera que la estructura de edades de la población de estos países es más joven. Sin embargo, aún prevalece la concepción errónea de que el cáncer de mama es un problema de mujeres de edad avanzada y de países de altos niveles socioeconómicos.

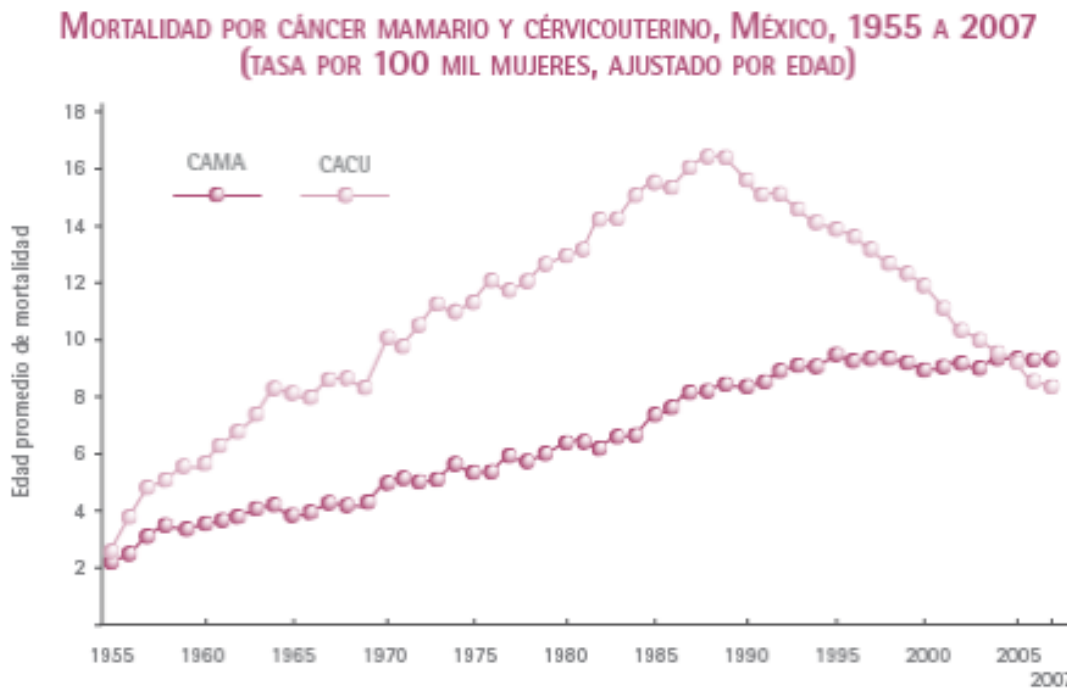
### **Tendencias en la mortalidad en México.**

En México, doce mujeres mueren diariamente a causa de cáncer de mama, lo cual representa, aproximadamente, una tercera parte de las pacientes diagnosticadas con este tumor maligno (17).

La tendencia observada en la mortalidad de esta enfermedad en nuestro país muestra incrementos constantes; basta mencionar que en el período de 1980 a 2005 se registraron un total de 67,854 defunciones por cáncer de mama, con un aumento estimado anual del 3.6% en los últimos 18 años (18,22,23). Adicionalmente, a partir de 2006 el cáncer de mama es la segunda causa de muerte general en mujeres de 30 a 54 años y la primera por cáncer, desplazando al cáncer cérvicouterino (19). Las tasas de mortalidad ajustadas por edad presentadas en la gráfica 2 muestran que la mortalidad por cáncer cérvicouterino en las mujeres mexicanas superó la mortalidad por cáncer de mama en el período 1955-2005. En 1980 el riesgo de morir por cáncer cérvicouterino era dos veces mayor respecto del cáncer de mama. No obstante, desde 1990 las tasas

de mortalidad por este cáncer descienden en forma rápida y constante. En sentido inverso, a lo largo del mismo período, las tasas de mortalidad atribuibles al cáncer de mama se incrementaron y para el año 2006, por primera vez, el cáncer de mama superó al cáncer cérvicouterino como causa de muerte entre las mujeres mexicanas (19). Es importante enfatizar que de acuerdo al análisis estadístico realizado por el Dr. Knaul y colaboradores se denota que a mayor edad de la paciente al momento del diagnóstico de cáncer de mama es menor el porcentaje de sobrevivencia (19) (Gráfica 2).

## GRAFICA 2



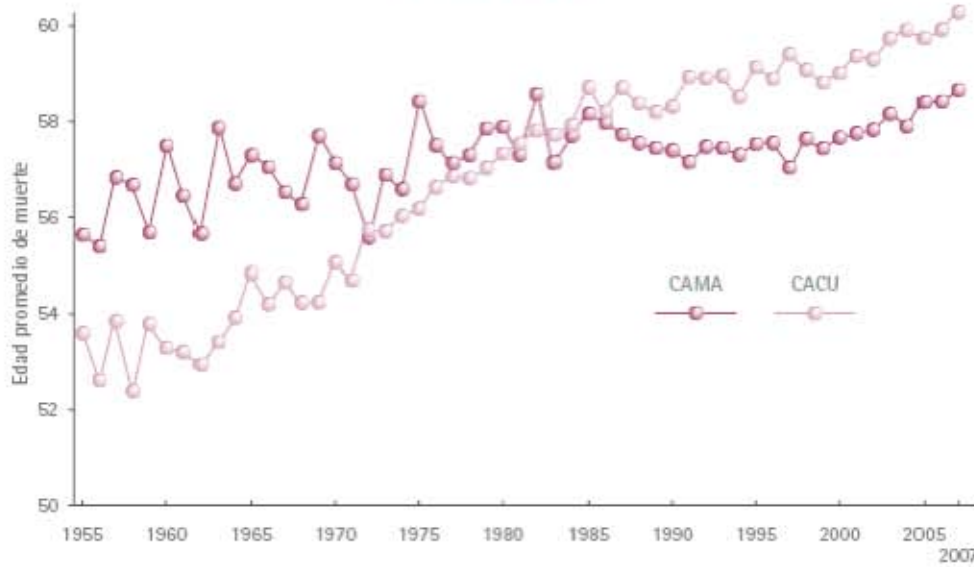
**Fuente**

Knaul, Nigenda, Lozano, et al. (2008 y 2009), con base en datos de la OMS, WHOSIS (1955-1979) y la Secretaría de Salud (1978-2002).

La disminución de la morbilidad y mortalidad por cáncer cérvicouterino en comparación con el cáncer de mama se observa no sólo a nivel nacional, sino también a nivel estatal y entre áreas geográficas, tanto en aquellas con un desarrollo económico mayor como en las zonas con un desarrollo económico menor. El riesgo de morir por cáncer de mama ha aumentado en la gran mayoría de las entidades federativas de la República Mexicana, aunque el fenómeno es mayor en el norte y el centro (20,24). En el Distrito Federal y Nuevo León, por ejemplo, las tasas de mortalidad observadas del cáncer de mama son mayores que las del cáncer cérvicouterino desde finales de la década de los ochenta. Si bien el cáncer cérvicouterino sigue siendo más común entre los segmentos pobres de la población, el cáncer de mama ha ganado terreno con rapidez. Aún en los estados con mayor marginación, donde el cáncer cérvicouterino presenta las mayores tasas de incidencia en el país (como Oaxaca y Tabasco), el cáncer de mama está próximo a desplazarlo de acuerdo a las tendencias de los últimos años, pues el primero muestra descenso, mientras que el segundo sigue en aumento (21)(Gráfica 3).

Gráfica 3

EDAD PROMEDIO DE LA MUERTE POR CÁNCER MAMARIO Y CÉRVICOUTERINO, MÉXICO, 1955 A 2007



Fuente

Knaut, Nigenda, Lozano, *et al.* (2008 y 2009), con base en datos de la OMS, WHOSIS (1955-1979) y la Secretaría de Salud (1979-2007).

Los carcinomas de la glándula mamaria se han convertido en la lesión tumoral maligna más frecuente en los países desarrollados con un millón de casos en el mundo por año.

En la actualidad, a pesar de los esfuerzos encaminados para conocer la etiología del cáncer de mama aún no se tiene la totalidad de los factores de riesgo y, por lo tanto no se ha logrado establecer una estrategia sólida de prevención. Estas observaciones sugieren que los factores ambientales, estilo de vida, particularmente la alimentación, el sedentarismo y la obesidad, así como el aumento en el consumo de alcohol y tabaco aunados a dietas saturadas de grasas y azúcar son factores de riesgo comprobados que propician el aumento de casos y, tienen un papel muy importante en la evolución de la enfermedad. Con base a este análisis epidemiológico podemos concluir que el cáncer de mama es un grave problema de salud pública de gran relevancia en nuestro país ( 22, 23).

### **Desarrollo del cáncer**

El desarrollo del cáncer es una proliferación celular descontrolada causada por factores físicos, químicos, genéticos o biológicos. El proceso de la división celular depende de una secuencia de eventos muy bien controlados. Estos eventos dependen de los niveles apropiados de la transcripción y traducción de ciertos genes. Cuando este proceso no ocurre como debería de ser, el resultado puede ser el crecimiento descontrolado de la célula. De los más o menos 25,000 genes que se piensa existen en el genoma humano, hay un grupo pequeño que parece importante para la prevención, desarrollo, y

progresión del cáncer. Se ha encontrado que estos genes están funcionando mal o no funcionan en varios tipos de cánceres (25,26).

Los genes que se han identificado hasta hoy han sido ordenados en dos categorías amplias, dependiendo de sus funciones *normales* en las células.

- Genes cuyas proteínas *estimulan* o aumentan la división y la viabilidad de las células. Esta es la primera categoría que incluye los genes que contribuyen al crecimiento de los tumores por medio de la inhibición de la muerte celular.
- Genes cuyos productos (proteínas) pueden *prevenir* directa o indirectamente la división celular o conllevar a la muerte celular.

Los genes en el primer grupo se llaman protooncogenes. Las versiones mutadas o dañadas de estos genes se llaman oncogenes. Los genes de la segunda categoría son conocidos como supresores de tumor (27,28).

Todos los cánceres demuestran alteraciones en uno o más de sus supresores de tumor y oncogenes. En las células normales, estos dos grupos de proteínas trabajan juntas para regular la división celular pero en las células cancerosas los controles ya no funcionan apropiadamente. Los protooncogenes que han sido identificados hasta hoy tienen funciones muy diferentes en la célula. A pesar de las diferencias en sus funciones normales, estos genes contribuyen a la división celular descontrolada si se encuentran presentes en la forma mutante (oncogénica). Las proteínas mutantes pueden retener algunas de sus habilidades anteriores pero ya no tienen la misma sensibilidad hacia los controles que las regulan, algunos oncogenes que están asociados con varios tipos de cáncer se mencionan en la tabla 2 (26):

Tabla 2.- Oncogenes asociados al cáncer de mama

• <i>Ras</i> :	Es una molécula para la transducción de señales.
• <i>Myc</i> :	Factor de transcripción.
• <i>Src</i> :	Una tirosina quinasa.
• <i>hTERT</i> :	Una enzima que funciona en la replicación celular.
• <i>Bcl-2</i> :	Una proteína para prevenir apoptosis.
• <i>HER-2/neu (erbB-2)</i> :	un receptor de factores de crecimiento.

Los genes supresores de tumor son genes cuyos productos sirven para controlar la división celular. Ellos difieren de los oncogenes en que los productos que producen los supresores de tumor inhiben la división de las células si las condiciones para su crecimiento no son completados. Las condiciones que activarían los "frenos" de la célula incluyen daños al ADN, falta de factores de crecimiento o defectos en el aparato de la división.

### **Tipos histológicos del cáncer de mama.**

Aproximadamente el 90% de todos los tumores en la mama se originan en los conductos o los lóbulos. El 75% comienza en las células cuboides y columnares que recubren internamente los conductos galactóforos, denominado carcinoma ductal infiltrante. El que comienza en los lobulillos se denomina lobular o lobulillar. El carcinoma ductal infiltrante es el más

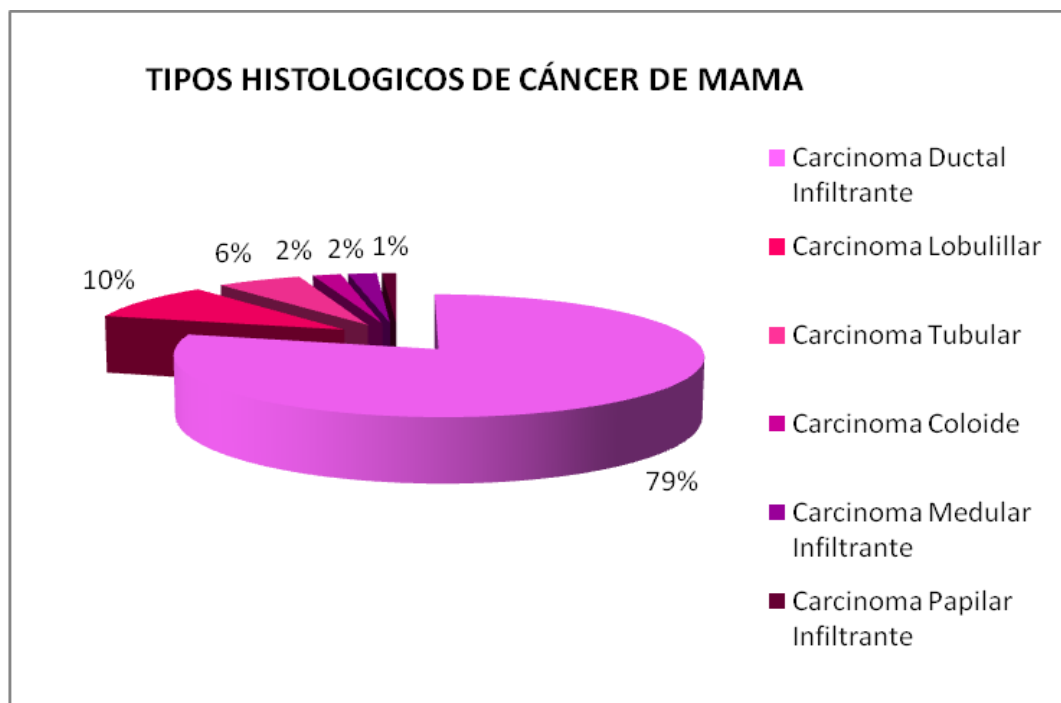
importante por su tipo histológico y distribución, ocurre en el 79-80% de los casos (8, 17, 22).

El resto de los tipos histológicos se describen en la gráfica 4.

**GRAFICA 4.**

**Fuente: SSA 2007**

**Frecuencia de los Tipos histológicos de cáncer de mama en México.**



**Receptores**

- En estadios iniciales, la mama es dependiente de estrógenos y la actividad mediada por sus receptores específicos. Aproximadamente el 55-70% de los cánceres de mama expresan receptores de estrógenos (RE) por lo que son candidatos a la terapia endocrina, aunque en algunos casos hay resistencia endócrina. Se ha visto que el incremento de co-activadores o



inhibición de co-represores, juegan un papel importante en esta resistencia. Inicialmente la expresión aberrante de co-reguladores podría ser utilizada como un marcador pronóstico suplementario para determinar la efectividad de la terapia endócrina o para monitorear la progresión del cáncer (23, 24). RE+: Aproximadamente el 80% de los casos de cáncer de mama son de receptores de estrógeno positivos.

- RE+/RP+: Alrededor del 65% de los casos de cáncer de mama con receptores de estrógeno positivos tienen también receptores de progesterona positivos. Esto significa que las células tienen receptores para ambas hormonas, que podrían estimular el crecimiento del cáncer de mama.
- RE+/RP-: Aproximadamente el 13% de los casos de cáncer de mama son de receptores de estrógeno positivos y de receptores de progesterona negativos. Esto significa que el estrógeno (pero no la progesterona) puede estar estimulando el crecimiento y la propagación de las células cancerígenas.
- RE-/RP+: Alrededor del 2% de los casos de cáncer de mama son de receptores de estrógeno negativos y de receptores de progesterona positivos. Esto significa que la hormona progesterona probablemente está estimulando el crecimiento de este cáncer. Solamente una pequeña cantidad de casos de cáncer de mama dan resultados negativos para receptores de estrógeno y positivos para receptores de progesterona. Se necesita más investigación para comprender mejor los tipos de cáncer de mama de receptores de progesterona positivos.

RE-/RP-: Si las células del cáncer de mama no tienen receptores para ninguna de las dos hormonas, se considera que el cáncer es de receptores de estrógeno negativos y de receptores de progesterona negativos (es decir, cáncer de receptores de hormonas negativos). Aproximadamente el 25% de los casos de cáncer de mama entran en esta categoría.

La presencia de ambos receptores RE y receptores de progesterona (RP), en un tumor aumenta la posibilidad de responder a la terapia hormonal aunque es importante destacar que el pronóstico también se ha relacionado con la edad de la paciente (25, 26).

### **La Mamografía**

La mamografía es, esencialmente, la única modalidad de imágenes ampliamente utilizada para detección de cáncer de mama. Varios grandes ensayos clínicos aleatorios han demostrado que la mamografía reduce la mortalidad por cáncer de mama. Investigaciones extensas en la dosis de radiación a la mama y su dependencia de la composición de la mama, mama espesor y rayos x se han documentado las características espectrales. Calcificaciones, o endurecimiento de tejidos blandos con depósitos de calcio, son especialmente importantes. A menudo son un signo de cáncer de mama, especialmente si las calcificaciones son pequeñas (microcalcificaciones) o de forma irregular. El estudio tiene algunas limitaciones. Imágenes es más difícil con mamas densas o pechos en mujeres más jóvenes. Senos con implantes o cicatrices quirúrgicas importantes también son difíciles de visualizar en la mamografía.

## **Ultrasonografía**

El papel del ultrasonido en la imagen de mama ha sido en gran parte limitado a aplicaciones como distinguir entre quística versus masas sólidas, evaluación de masas palpables y aguja core biopsia. En los últimos años, el número de indicaciones se ha ampliado enormemente y ecografía de mama es ahora una modalidad esencial en la imagen de la mama. Color a Doppler y más recientemente se ha utilizado la ecografía Doppler de energía sensible para una evaluación adicional de la mama. En 2002 Kolb publicó un artículo fundamental que muestra una mayor sensibilidad (97% frente a 74%) cuando es realizada junto con la mamografía en comparación contra el examen físico junto con mamografía. Sin embargo, también hubo una disminución sustancial en el valor predictivo positivo con mamografía más ecografía (11.2%) en comparación con solo la mamografía (22,6%). Ultrasonido se ha convertido en una valiosa herramienta para usar con mamografías porque es ampliamente disponible, no invasivo y menos costes que otras opciones. Pero, valor de prueba de ultrasonido depende del operador de habilidad y experiencia.

Entre los procedimientos de detección se incluyen la autoexploración y el examen clínico, (27, 28). Desde el año 1950, en que se desarrolló la técnica especial de mamografía, este examen de diagnóstico por imágenes, que con los años se ha desarrollado mucho y ha alcanzado un alto grado de certeza, es un auxiliar de primera línea para conseguir estos objetivos. Ha tenido algunas evoluciones técnicas importantes en los últimos años, con una consecuente mejoría en la calidad de las imágenes y por consiguiente en su capacidad diagnóstica.

La mamografía moderna puede detectar lesiones muy pequeñas de más o menos 5 mm, lesiones que son imposibles de palpar, así como las microcalcificaciones (menores de 1 mm) que son un elemento primordial en la detección precoz del cáncer de la mama, ya que el 71% de los llamados “Cáncer de Mama Mínimo” son diagnosticados por su presencia aislada. Sin embargo, incluso con una mamografía de elevada calidad, alrededor de 5 a 10% de los cánceres no son diagnosticados por esta técnica. Una de las causas más frecuentes para este hecho son las mamas radiológicamente densas, que están compuestas casi fundamentalmente por tejido fibroglandular denso (frecuente en los grupos jóvenes), por este motivo no se debe solicitar mamografía a una paciente menor de 35 ó 40 años, esto de acuerdo al criterio del especialista, porque las lesiones malignas pueden ser muy difíciles de distinguir del tejido normal envolvente que no ofrece el contraste suficiente para hacerlas visibles (sería como buscar una bola blanca de billar en un campo de nieve). Los criterios mamográficos más importantes de sospecha de cáncer mamario son:

- 1.- Una tumoración dominante o asimétrica
- 2.- Micro-calcificaciones típicas
- 3.- Un patrón estelar de tejido más denso
- 4.- Bandas de tejido más denso hacia la periferia
- 5.- Retracción cutánea o del pezón
- 6.- Engrosamiento de la piel

En México, donde la mayoría de los tumores malignos de mama son diagnosticados en etapa avanzada, las mamografías se han utilizado casi totalmente con fines diagnósticos (18,24). El beneficio de la detección temprana del cáncer de mama es el fundamento para programas alrededor del mundo que

buscan reducir la morbilidad y mortalidad relacionada con este padecimiento. Estos programas abarcan desde los de tipo educativo, orientados a mujeres y profesionales de la salud, hasta programas de monitoreo organizados que tienen como objetivo grupos específicos de edad. Existe un consenso en cuanto a que los programas deben estar diseñados basándose en la carga de la enfermedad y los recursos disponibles, pero incluso en los países con recursos más limitados tienen la oportunidad para reducir las muertes de cáncer de mama a través de un diagnóstico oportuno y un tratamiento eficaz. Los programas de detección son más eficaces cuando están organizados, y los planeadores del programa deben considerar los criterios de la OMS y la información local como bases para ajustar las necesidades de la población.

A pesar de ello, el pronóstico es grave y las pacientes que se encuentran ya en tratamiento, en el 30% de los casos tienen metástasis aún con nódulos negativos, resultando en diseminación y muerte (27).

Por otro lado el estudio de factores relacionados con el pronóstico de la enfermedad ha enfatizado la importancia de las características celulares y demográficas en la supervivencia y mortalidad de las mujeres con cáncer mamario. Clínicamente se toma en consideración la clasificación TNM (Tumor-Nódulo-Metástasis) (Tabla 3).

*TABLA 3 Clasificación TNM*

**ESTADIO I:**

T1	N0	M0
----	----	----

**ESTADIO II.**

T0	N1	M0
T1	N1	M0
T2	N0	M0
T2	N1	M0
T3	N0	M0

**ESTADIO III:**

Cualquier T3 con cualquier N	M0
------------------------------	----

Cualquier T4 con cualquier N	M0
------------------------------	----

**ESTADIO IV:**

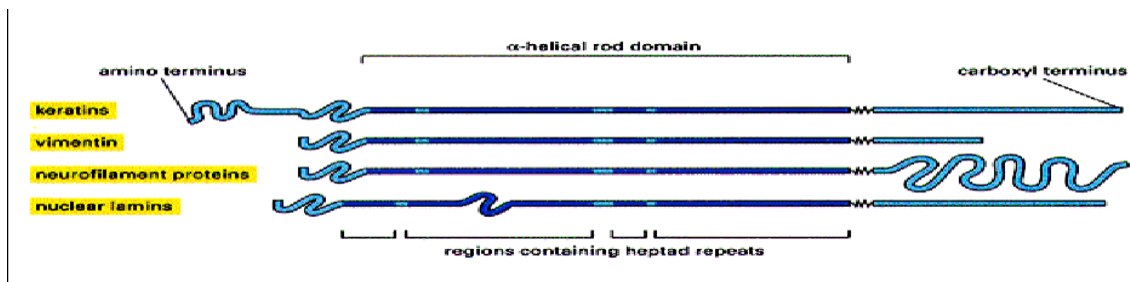
Cualquier T con cualquier N	M1
-----------------------------	----

Las características celulares notificadas con más frecuencia incluyen la estirpe histológica, otra característica celular es el grado histológico de diferenciación. De manera adicional, se ha señalado la presencia de receptores hormonales y algunos marcadores de proliferación celular como HER2/neu, p53, Bcl-2 entre otros.(28, 30).

## **Antecedentes específicos**

Desde hace una década existen estudios donde detectan la presencia de citoqueratina en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama (29,31,32). Las citoqueratinas (Ck's) son filamentos intermedios que se encuentran dentro de las células epiteliales y son esenciales para la estructura normal y funcionamiento del tejido, son responsables de la integridad mecánica celular y tienen una participación crítica en la división celular, motilidad y el contacto célula-célula (33,34,35,36,37). Las CKs epiteliales están conservadas filogenéticamente y están fuertemente relacionadas bioquímica e inmunológicamente, a la fecha se conocen 20 tipos, divididas con base en su homología : tipo II, básicas – 1 a 8 - y tipo I, ácidas – 9 a 20 -. (38, 39,40). Las citoqueratinas son codificadas por una amplia familia multigénica de aproximadamente 50 diferentes miembros, aunque tienen débil afinidad con otros filamentos intermedios y en general tienen una estructura similar con tres dominios, amino terminal, carboxilo terminal y un dominio alfa hélice (41,42,43) ( Fig 1).

Figura 2. Estructura de los filamentos intermedios. Fuente: Carrillo et al 2006



La expresión de estas Ck's se produce con frecuencia en un órgano o tejido específico, por ejemplo, la CK7 se expresa en epitelio del tracto genitourinario mientras que CK20 es más común en el tracto gastrointestinal (44,45,46,47).

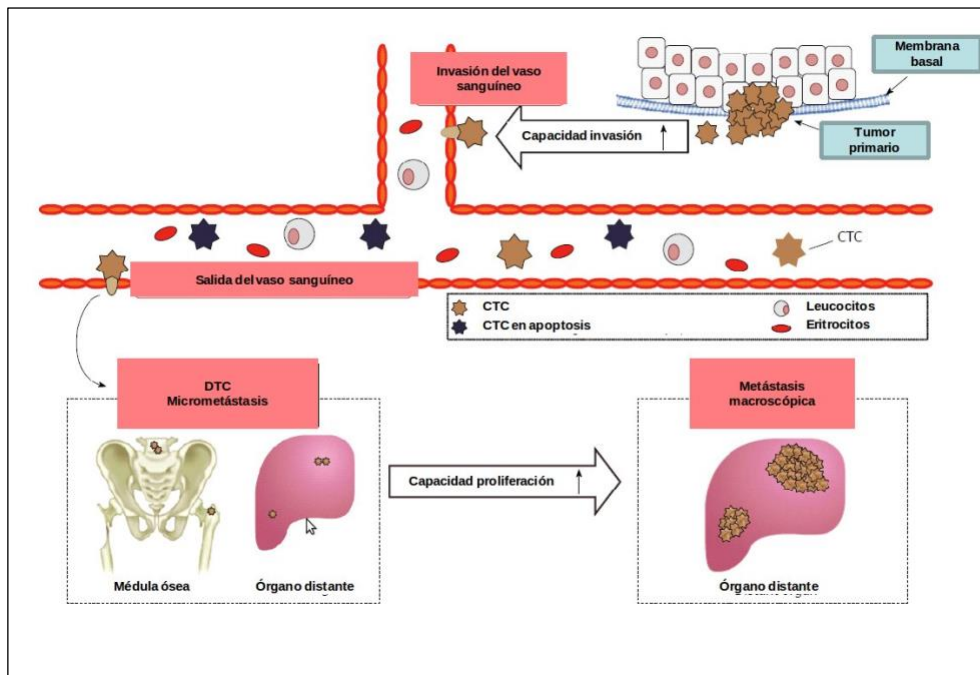
Los subgrupos de Ck's que expresa una célula epitelial dependen principalmente del tipo de epitelio, del momento de diferenciación terminal y de la fase de desarrollo (48,49). Por lo tanto, son como huellas dactilares que permiten clasificar todos los epitelios según su perfil de expresión (50,51,52,53).

Además, esto también se aplica a la contraparte maligna del epitelio (los carcinomas) (54,55, 56), ya que el perfil de citoqueratina tiende a permanecer constante cuando el tejido sufre una transformación maligna (57,58,59).

Normalmente, las Ck's muestran muy baja solubilidad, modificaciones post-traduccionales en el dominio central son relativamente raras pero en los extremos N- y C- terminal (60,61,62), como fosforilación glicosilación y transglutaminación, influyen en la actividad biológica de los filamentos resultando en incremento de la solubilidad y reorganización (63,64,65).



FIGURA 3 CELULAS TUMORALES CIRCULANTES Y EL PROCESO METASTASICO



Células tumorales circulantes y el proceso metastásico. Las CTCs a partir del tumor primario, alcanzan el torrente sanguíneo siendo capaces de sobrevivir durante largos periodos de tiempo hasta que se filtran en la médula ósea o en los órganos, dando lugar a micrometástasis que originarán metástasis macroscópicas identificables por pruebas de imagen. **REVISTA EUBACTERIA (ABRIL 2012) NO 28 / ISSN-1697-0071/ 1Luis Francisco Sáenz Mateos**

Recientemente, se ha considerado el papel de las Ck's durante la apoptosis (66,67,68). La falla de las células que llevan a una muerte celular apropiada se ve en varias patologías incluyendo cáncer (69, 70, 71). Las características morfológicas de apoptosis como la fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos (73,73,74), son el resultado de un rompimiento vía caspasas (75,76,77), la mayoría de las Ck's son sustrato para caspasas, una consecuencia de esta digestión es la exposición de un epítipo sugiriendo como causa de los fragmentos encontrados en el espacio extracelular (78,79,80,81).

La utilidad clínica de las CKs como marcadores tumorales está bien establecida y reflejan actividad tumoral teniendo un valor predictivo de la enfermedad muy preciso (82,83); pudiendo detectarse antes que el resto de los métodos convencionales, siendo una buena herramienta para ver efectividad de un tratamiento y con ello tomar decisiones mucho mas precisas (84,85,86,87).

Uno de los estudios de Cks más utilizados es la medición de fragmentos solubles de CK19 (88,89), como marcador de cáncer de mama, colon pulmón y vejiga, viendo la necesidad de utilizar otros marcadores que contribuyan a su especificidad (90,91,92,93,94).

Algunos estudios han buscado la presencia de la expresión de CK19 en la pacientes con cáncer de mama tratándolo de relacionar desde los estadios tempranos como un valor de mal pronóstico llegando a compararlo incluso con la clasificación TNM (95,96), receptores de estrógenos (97,98), grado histológico (61,99). entre otros, refiriendo que la presencia de CK-19 es un factor de mal pronóstico (100,101). Por otro lado no es claro si el DNA libre que es amplificado en sangre periférica es de CTCs o si proviene de tumores primarios, tumores metastásicos o de tejido normal; con la RT-PCR se han identificado en sangre periférica pequeñas cantidades de moléculas de mRNA específicas de determinadas proteínas que sólo son expresadas por las células epiteliales de tumores solidos. Este fenómeno además de demostrar la presencia de la célula tumoral en sangre, también demuestra que posee su maquinaria de transcripción activa y que por tanto su capacidad invasiva está intacta.

Con el uso de la RT-PCR se ha conseguido aumentar la sensibilidad, pudiendo discriminar la transcripción ilegítima, resolviendo en gran parte los falsos positivos que puedan aparecer. Aunque estas técnicas indirectas presentan el inconveniente de no poder observar la morfología celular, lo compensan con la posibilidad de usar gran cantidad de marcadores moleculares simultáneamente aumentando la sensibilidad y la especificidad de una forma significativa, convirtiéndose en un método idóneo para la detección de recidivas por vía hematológica y para identificar el alto riesgo de metástasis en el cáncer de mama.

### **Papel de las CTCs en el cáncer de mama**

Las CTCs han sido ampliamente estudiadas por su valor pronóstico en el cáncer de mama. Cuando están presentes en sangre periférica, después de una cirugía potencialmente curativa, es lógico pensar en riesgo de recidiva y por tanto las pacientes son obvias candidatas al tratamiento adyuvante.

Hay autores que sugieren que la detección precoz del cáncer de mama metastásico se puede realizar mediante la detección de CTCs mediante la cuantificación por CellSearch<sup>®</sup> (59), RT-PCR (73) y RT-PCR a tiempo real con el marcador CK19(74), proponiéndolo como un factor pronóstico independiente que disminuye el intervalo libre de enfermedad (disease-free interval, DFS) y la supervivencia general ("overall survival", OS). A la misma conclusión han llegado otros investigadores usando otros marcadores como la Maspina, que es una proteína relacionada con la familia serpina de inhibidores de la proteasa, sintetizada por las células epiteliales del tejido mamario (87,89).

También la Mamo- globina (MGA) proteína que exhibe homología con varias proteínas secretoras epiteliales (61), formando parte de la superfamilia de las secretoglobinas (SCGB). La determinación de MGA se ha convertido en uno de los principales métodos para la detección de CTCs mediante RT-PCR, y es el marcador de cáncer de mama más estudiado después de la CK-19, proponiéndolo como un indicador pronóstico adicional.

La citometría de flujo es un tecnología que nos proporciona información cuantitativa precisa, analiza células rápida e individualmente comparándola incluso con la RT-PCR por lo que recientemente se ha propuesto como método que indica la progresión de cáncer de mama en los estadios II A IV. (53,66).

## JUSTIFICACION

A nivel mundial, el cáncer de mama es el cáncer más común entre las mujeres, registrándose 411,000 muertes al año a causa de esta enfermedad. Éste es el cáncer más prevalente a nivel mundial: en los últimos cinco años hay 4.4 millones de mujeres que viven con la enfermedad. En México, 12 mujeres mueren diariamente a causa de cáncer mamario, lo cual representa, aproximadamente, una tercera parte de las pacientes diagnosticadas con este tumor maligno(10), adicionalmente, a partir de 2006 el cáncer de mama es la segunda causa de muerte general en mujeres de 30 a 54 años y la primera por cáncer, desplazando al cáncer cérvicouterino.

En diversos estudios se ha comprobado la presencia de células tumorales en aspirados de médula ósea de pacientes con cáncer de mama, mediante RT-PCR, pudiendo establecer un valor pronóstico y en algunos casos un plan de tratamiento más adecuado (7).

Con lo anterior se hace necesario establecer técnicas que ayuden en el diagnóstico temprano, indique la presencia de recurrencia y en lo posible con menor riesgo para las pacientes. Recientemente la detección de CK19 soluble en sangre periférica mediante citometría de flujo se ha propuesto como una técnica que pudiera reunir estas características (27, 56, 57, 58).

Por tal motivo en este trabajo se determinó la presencia de CK19 en sangre periférica en pacientes con cáncer de mama.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Será la presencia de CK19 mediante citometría de flujo un buen método para detectar el cáncer de mama en todos los estadios?

## **HIPOTESIS DE TRABAJO**

La detección de CK19 mediante citometría de flujo es un buen método diagnóstico para detectar cáncer de mama en todos los estadios.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la expresión de CK19 en linfocitos de pacientes con cáncer de mama como marcador de presencia de dicha patología.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.1. Se determinará la relación entre la expresión de CK19 y el estadio del cáncer.
- 1.2. Se asociará la presencia de CK19 con el estadio clínico
- 1.3. Se comparará con los resultados de estudio de mamografía.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Conformación de los grupos**

#### **TIPO DE ESTUDIO**

Se realizó un estudio observacional, prospectivo comparativo, transversal.

#### **UNIVERSO Y MUESTRA DE TRABAJO**

##### **POBLACION**

Se trabajó con muestras de sangre periférica de pacientes del Hospital Juárez de México, mientras que la investigación se efectuó en el laboratorio central, laboratorio de citometría de flujo en la unidad de Investigación del Hospital Juárez de México, así como en la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

#### **CRITERIOS DE SELECCIÓN**

##### **a) Criterios de inclusión**

- Pacientes que lleguen a la consulta de mama por primera vez al servicio de oncología del Hospital Juárez de México.
- Pacientes que firmen el consentimiento informado.
- Pacientes sin antecedentes de otro tipo de neoplasias.

#### **b) Criterios de no inclusión**

- Pacientes ya tratadas por cualquier tipo de cáncer.
- Pacientes que no se pueda recolectar la muestra.
- Pacientes embarazadas.
- Menores de edad.
- Pacientes con retraso mental.

#### **c) Criterios de eliminación**

- Pacientes que deseen retirar su consentimiento informado.

### **FORMACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO**

#### **Demarcación**

Se confirmó la viabilidad de la muestra realizando cuantificación de leucocitos inicial.

Tubos para citómetro de flujo (falcon 2052)

Tubos de plástico 12x75

Tubos vacutainer tapón lila 12x75

Pipetas automáticas de 20.50.100, 500 y 1000µl

Puntas para pipetas automáticas

#### **Reactivos**

Solución de lisis para glóbulos rojos 1:10 (Becton Dickinson)

Amortiguador salino de fosfatos ph 7.35 (facs flow)

Solución permeabilizadora bd

Anticuerpo monoclonal ck19



## **Variables**

### **Variable Independiente**

Presencia de tumoración mamaria - ordinal de acuerdo a la clasificación TNM

Resultado histopatológico de la biopsia

Resultado de estudio de radiodiagnóstico se mide en Brads nominal

### **Variable Dependiente**

Presencia de CK19 en células de sangre periférica (semicuantitativa – se otorga un porcentaje en un número predeterminado de células).

### **Obtención y procesamiento de las muestras**

Previo consentimiento informado, se tomaron muestras de sangre periférica en tubos con EDTA de las pacientes que cubran los criterios de inclusión, eliminando los primeros 5ml, para evitar contaminación con la piel.

Se llevó a cabo la cuantificación de las células nucleadas en el analizador automático para biometría hemática Cell Dyn 3000  $\times 10^6/\mu\text{L}$ . Se ajustó la cantidad de  $0.5 - 1 \times 10^6/\text{L}$  de células nucleadas en PBS a partir de la cual se tomaron alícuotas de  $120\mu\text{L}$  para ser depositadas en los tubos Falcon, posteriormente se determinó la cantidad de células positivas para CK19 por citometría de flujo, en cada muestra del paciente.

### **Tinción**

Para la detección de células positivas para CK19 se colocaron en un tubo Falcon  $0.5 - 1 \times 10^6/\text{L}$  células mononucleares viables en  $100\mu\text{L}$  de anticuerpo marcado con CK19. Se procedió a la permeabilización de las células con 200ml de

solución permeabilizadora por 7 minutos, luego se lavó con amortiguador de fosfatos, se resuspendió, se volvió a centrifugar a 300 x g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en vórtex a baja velocidad y se adicionaron 20 µL de anticuerpo monoclonal CK19. Se mezcló e incubó durante 25 minutos a 4°C en la oscuridad.

Transcurrido este tiempo se adicionaron 2 mL de PBS, se centrifugó, decantó y se resuspendió en PBS para la adquisición de datos.

### **Adquisición de datos**

La adquisición de los datos se realizó por medio del programa Cell Quest Pro versión 3.2.1. Apple System 7.6.1, analizando 500 000 eventos totales, posteriormente, en un gráfico de puntos ajustando primero la autofluorescencia de las células, colocando los marcadores de los cuadrantes en un valor entre 10<sub>1</sub> y 10<sub>2</sub> tanto para el eje de las abscisas como para el eje de las ordenadas, colocando dicha autofluorescencia en el cuadrante inferior izquierdo.

### **Análisis**

La selección de la región de las células de interés (R1) se hizo a partir de una gráfica de puntos “dot plot” se analizó la expresión de las células CK19 +. Se obtuvieron los resultados de dicha región en forma de porcentaje. se compararon y analizaron los resultados.

### **Inmunohistoquímica de líneas celulares de cáncer de mama.**

Se recabaron los datos obtenidos en las biopsias de cáncer de mama sobre receptores de estrógenos, receptores de progesterona y Her2/neu

## **Captura y procesamiento estadístico de datos**

Aceptamos un riesgo de 0.05 y deseamos un poder estadístico de 90% para detectar diferencias si es que existen.

El procesamiento de los resultados se realizó con el programa SPSS.18, utilizando ANOVA de un solo factor, particularmente con el modelo lineal general univariante, se analizó la homogeneidad de los grupos con prueba Levene y la variabilidad entre grupos con la prueba de Tukey.

## RESULTADOS

Se incluyeron 42 pacientes de las cuales 13 fueron controles sanas y 29 positivas a cáncer de mama, el promedio de porcentaje de presencia CK19 en las pacientes con resultado de biopsia negativa fue de 7.1, en el estadio clínico (EC) I de 34.81 con 7 casos, en EC II de 38, con 7 casos, en EC III 62.9 con 10 casos, y en el EC IV de 90.46, con 5 pacientes, aunque aparentemente los resultados son diferentes en el grupo de las pacientes control –negativas a cáncer-, hubo una paciente con niveles muy cercanos a los que las pacientes de estadio I presentaban, así mismo entre el estadio I y II la diferencia no es significativa muy por el contrario en las pacientes con EC III y IV.

Niveles de porcentaje CK19 según estadio

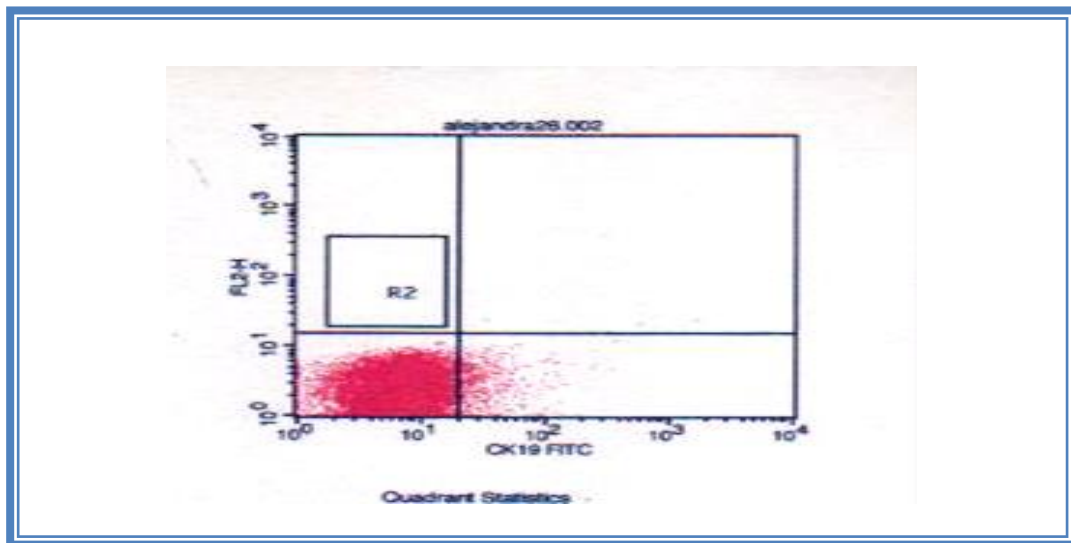
TABLA 4

NEGATIVAS	I	II	III	IV
3.22	34.87	34.28	72.55	82.02
15.99	35.80	26.58	71.34	93.70
2.31	38.59	43.66	30.68	88.34
11.69	28.40	53.05	71.34	94.66
3.92	27.93	42.55	66.65	93.62
25.99	44.87	22.40	68.40	
2.87	33.22	43.26	72.35	
1.29			62.22	
7.95			56.03	
10.00			57.48	
3.22				
1.00				

En la tabla anterior se pueden apreciar los porcentajes de positividad para CK19 en los diferentes grupos, o el promedio para el grupo control negativo de 7.1%, en el grupo de estadio I de 33.70%, del estadio II de 38.6%, del estadio III de 62.9% y del estadio IV de 90.1% claramente, son mayores mientras mayor es estadio de las pacientes

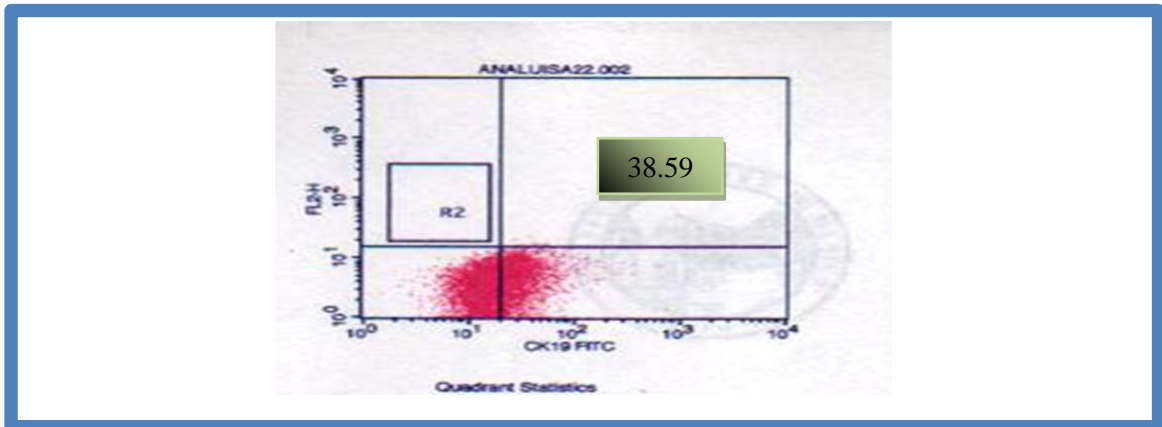
### CONTROL PACIENTE SANA □

**FIGURA 4**



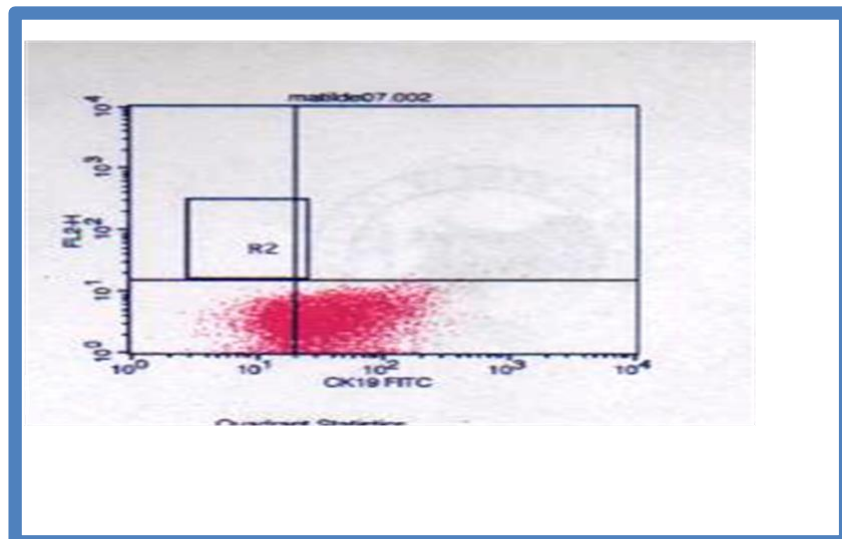
La figura 4 muestra claramente la baja presencia de células que se marcan con el anticuerpo monoclonal para CK19, en la región del cuadrante inferior izquierdo en éste caso fue de una paciente control negativa a cáncer con 2.31% de positividad, mientras que el promedio de este grupo fue de 7.1%.

**FIGURA 5. ESTADIO I**



La figura 5 muestra la imagen de positividad de 38.59% en un paciente con estadio I, cabe mencionar que el promedio de positividad para CK19 en las pacientes para este estadio fue de 33.70

**FIGURA 6. ESTADIO II**



La figura 6 muestra la imagen de positividad de una paciente clasificada dentro del estadio II con 56.58% de positividad aunque el promedio para este grupo es de 38.6%

56.58

### ESTADIO III

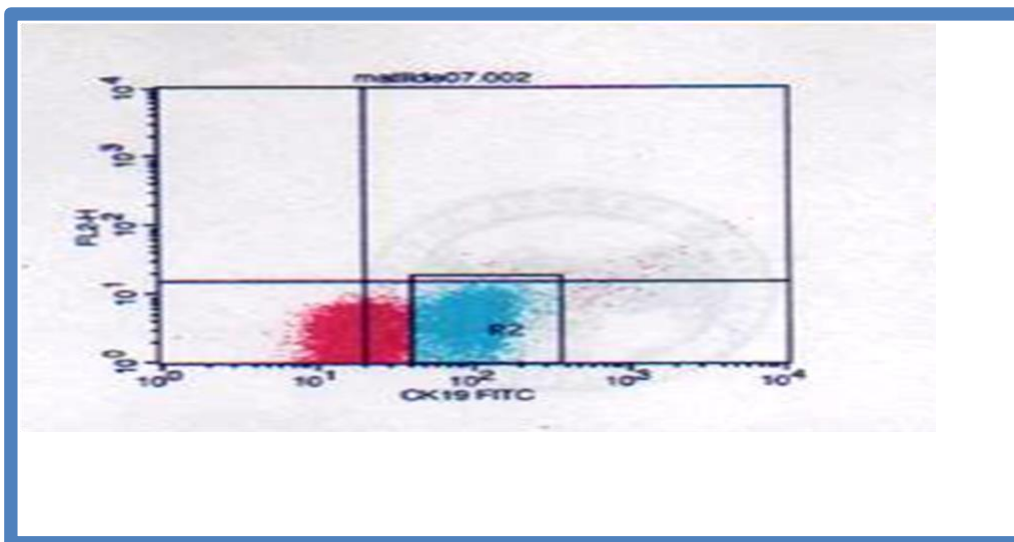
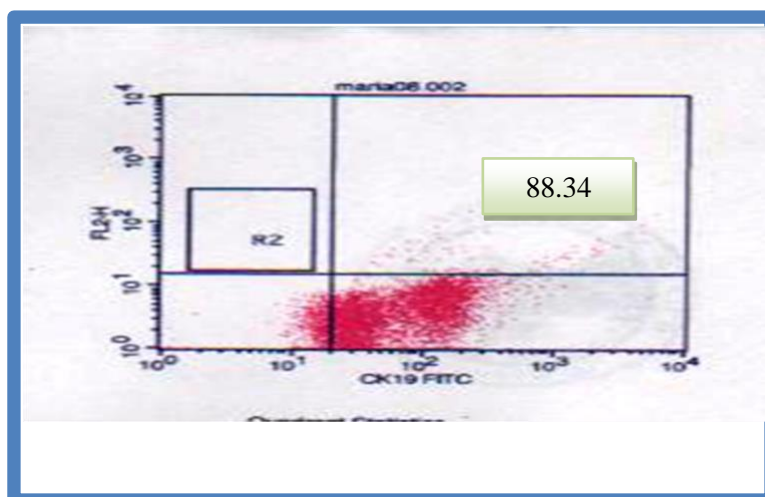


FIGURA 7

La figura 3 muestra un aumento significativo en el porcentaje de células marcadas positivamente a CK19 con 71.34% en una paciente con clasificada en el estadio III y un promedio de 62.9% en este grupo.

FIGURA 8. ESTADIO IV

71.34



La figura 8 muestra la en el cuadrante inferior derecho, la positividad de una muestra de una paciente clasificada en el estadio IV con 88.34%, mientras que el promedio de positividad en este grupo fue de 90.1%.

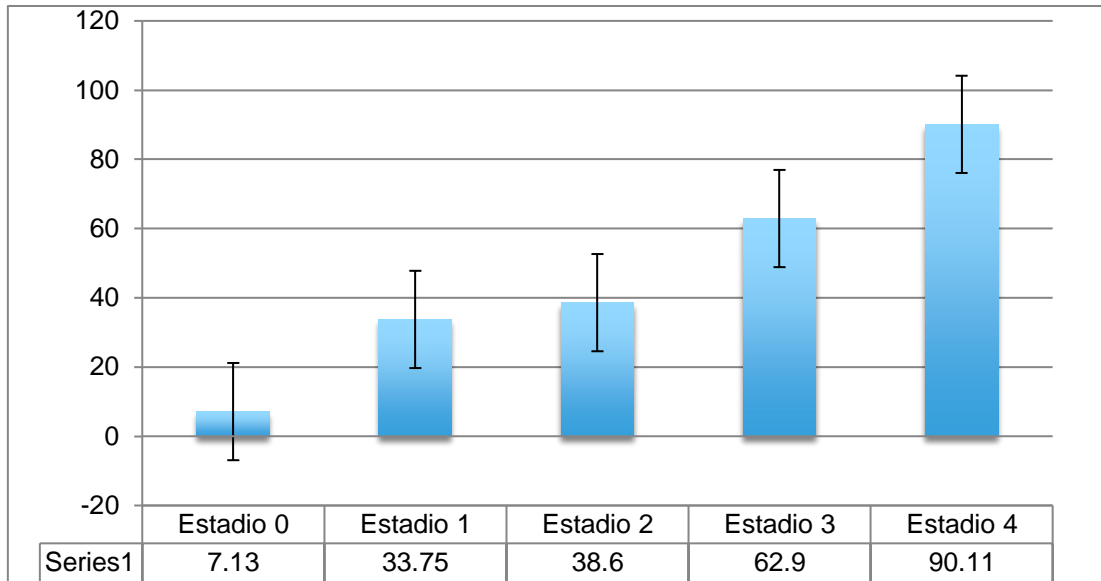
**TABLA 5. NIVELES PROMEDIO DE CK19 POR GRUPO**

Podemos observar el número de pacientes por grupo: las controles negativas a cáncer fueron 13, del estadio I fueron 7, del estadio 2 fueron 6 pacientes, del estadio 3 fueron 10 pacientes y del estadio 4 fueron 6 pacientes; las medias por grupo únicamente entre el estadio 1 y 2 son muy parecidos. Además se puede apreciar que el intervalo de confianza por grupo no son desproporcionados, al igual que los niveles de los límites superior e inferior.

	N	Media	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mini mo	Máximo
			Límite inferior	Límite superior		
estadio 1	7	33.7514	30.0360	37.4669	27.93	38.59
estadio 2	6	38.6000	26.3954	50.8046	22.40	53.05
estadio 3	10	62.9040	53.7170	72.0910	30.68	72.55
estadio 4	6	90.1117	85.0209	95.2025	82.02	94.66
negativo	13	7.1300	2.7411	11.5189	1.00	25.99
Total	42	41.1967	31.7608	50.6325	1.00	94.66



## HISTOGRAMA QUE MUESTRA LA CUANTIFICACION DE CK19 POR GRUPO



**TABLA 6**

Tabla de comparaciones múltiples que muestra el análisis inter e intra-grupos de Tukey de los niveles de positividad de ck19

(I) paciente	(J) paciente	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
estadio 1	estadio 2	.868	-19.2298	9.5326
	estadio 3	.000	-41.8912	-16.4139
	estadio 4	.000	-70.7414	-41.9791
	negativo	.000	14.5031	38.7397
estadio 2	estadio 1	.868	-9.5326	19.2298
	estadio 3	.000	-37.6525	-10.9555
	estadio 4	.000	-66.4357	-36.5876
	negativo	.000	18.7122	44.2278
estadio 3	estadio 1	.000	16.4139	41.8912
	estadio 2	.000	10.9555	37.6525
	estadio 4	.000	-40.5562	-13.8592
	negativo	.000	44.9012	66.6468
estadio 4	estadio 1	.000	41.9791	70.7414
	estadio 2	.000	36.5876	66.4357
	estadio 3	.000	13.8592	40.5562
	negativo	.000	70.2238	95.7395
negativo	estadio 1	.000	-38.7397	-14.5031
	estadio 2	.000	-44.2278	-18.7122
	estadio 3	.000	-66.6468	-44.9012
	estadio 4	.000	-95.7395	-70.2238

En la tabla anterior se puede ver que existe diferencia estadísticamente significativa entre las pacientes que fueron negativas a cáncer y las pacientes de cualquier estadio, además la variación intra-grupos, la diferencia a excepción de entre los grupos I y II es al igual estadísticamente significativa.

#### **TABLA 7**

**Tabla de comparaciones múltiples de Tukey que muestra los niveles de BIRADS por grupo.**

paciente	(J) paciente	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
estadio 1	estadio 2	.999	-1.6634	1.3777
	estadio 3	.651	-1.9897	.7040
	estadio 4	.029	-3.1634	-.1223
	negativo	.996	-1.1164	1.4461
estadio 2	estadio 1	.999	-1.3777	1.6634
	estadio 3	.847	-1.9113	.9113
	estadio 4	.069	-3.0779	.0779
	negativo	.965	-1.0412	1.6566
estadio 3	estadio 1	.651	-.7040	1.9897
	estadio 2	.847	-.9113	1.9113
	estadio 4	.272	-2.4113	.4113
	negativo	.279	-.3419	1.9573
estadio 4	estadio 1	.029	.1223	3.1634
	estadio 2	.069	-.0779	3.0779
	estadio 3	.272	-.4113	2.4113
	negativo	.004	.4588	3.1566
negativo	estadio 1	.996	-1.4461	1.1164
	estadio 2	.965	-1.6566	1.0412
	estadio 3	.279	-1.9573	.3419
	estadio 4	.004	-3.1566	-.4588

En la tabla anterior que muestra los BIRADS por grupo encontrando que únicamente con el estadio IV la diferencia es estadísticamente significativa.

Por otro lado no existió diferencia estadísticamente significativa con respecto a la presencia de receptores de estrógenos, de progesterona Her2/neu y el porcentaje de CK19 encontrado.

## DISCUSIÓN

Es preocupante el incremento que han presentado los casos de cáncer de mama en la población mundial. En nuestro país, también se ha presentado este incremento, probablemente se deba a las modificaciones en nuestra alimentación y al sedentarismo, así como la falta de medidas preventivas y de detección eficaces, sin embargo, debemos de enfocar nuestro esfuerzo para encontrar métodos confiables que puedan detectar el padecimiento desde estadios tempranos y con ello disminuir su mortalidad. Actualmente casi el 10% de las mujeres tienen riesgo de desarrollar cáncer y a pesar de que existen mejores medicamentos, el pronóstico a 5 años es de menos del 50% (5,26).

El estudio de factores relacionados con el pronóstico de la enfermedad ha enfatizado la importancia de las características celulares y demográficas en la supervivencia y mortalidad de las mujeres con cáncer de mama.

Estudios previos indican que células epiteliales del tumor inicial pueden ser reconocidas en sangre periférica (células tumorales circulantes, CTC), las cuales han sido asociadas a recurrencia y metástasis del cáncer de mama. Las CKs y en especial CK19 se ha propuesto como un marcador útil para detectar células tumorales en sangre periférica y con ello predecir la recurrencia mejorando por lo tanto la sobrevida. Existe evidencia que esta liberación no solo es por un proceso de apoptosis, - sugiriendo incluso- que pueden contribuir a la progresión del cáncer, dando un valor estadísticamente más significativo con respecto a la presencia de otras líneas celulares cancerosas ya previamente conocidas como MUC1, los receptores de estrógenos y la clasificación TNM, aunque también se ha sugerido su uso simultáneo para elevar su sensibilidad y especificidad o incluso en combinación con otros marcadores moleculares.

La citometría de flujo es una tecnología que aparte de dar información precisa es rápida y en cuanto a la cuantificación de poblaciones celulares se ha comparado con la precisión de RT-PCR(Wang) y así con ello evitar la expresión ilegítima.

En este estudio se analizaron 42 muestras de pacientes que acudieron a la consulta de mama por primera vez, podemos observar que existe diferencia significativa entre el grupo de mujeres sanas y las pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, aunque el número de casos es bajo, si nos abre una puerta para continuar su vigilancia e incluso de estos mismos grupos viendo el seguimiento y realizar varias medidas a lo largo de su tratamiento y vigilancia.

Del grupo control vale la pena ver el seguimiento, ya que incluso algunos investigadores (33,46) proponen que se pueden encontrar CTC con meses de antelación a la presencia clínica del cáncer y así poder establecer una ventana de diferencia en cuanto a las pacientes sanas y en las que podemos pensar tienen riesgo de desarrollar cáncer. Por otro lado tal como lo sugiere Ignatidis y Banbarg entre otros investigadores es conveniente que se incremente el número de marcadores que también se han relacionado con la presencia de CTC (48,54,56) y en un futuro establecer un tamizaje de fácil acceso y con alto índice de sensibilidad. Los estudios de CTC dan un nuevo valor que pueda utilizarse como valor pronóstico y puede en tiempo real redirigir el tratamiento en pacientes con cáncer de mama. Ignatiadis (2008) y Wallwierner (2011), sugieren que la presencia de CK19 podría buscarse en los nódulos centinelas siendo superiores a otros marcadores ya estudiados como p63, receptores de

estrógenos o junto con ellos como *MGB1* (Reinholz) y HER2 (Ignatiadis) y en pacientes bajo tratamiento o incluso posterior al mismo.

El uso de la gran variedad de métodos de detección para CTCs dificulta la comparación de los resultados entre los distintos estudios. Por esta razón es necesario realizar nuevos estudios clínicos para corroborar si la detección de CTCs en pacientes con cáncer de mama (principalmente en las pacientes sin evidencia de metástasis), puede brindar un pronóstico en la evolución de la enfermedad y contribuir en la elección del tratamiento que haya que seguir para prevenir su recidiva. En el caso del paciente metastásico, sería útil para monitorizar la respuesta al tratamiento, indicando quien responde a la terapia y quien no, posibilitando nuevos tratamientos y evitando efectos secundarios innecesarios.

La estandarización de estas técnicas para la determinación de CTCs en los laboratorios clínicos asistenciales es hoy día relativamente sencilla y quizá en un futuro cercano, la detección de este tipo de células y su estudio genético en profundidad, podría ser una herramienta predictiva útil para la individualización del tratamiento del cáncer de mama.

## CONCLUSIONES

- La presencia de CK19 en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama se encuentra más elevado mientras mayor es el estadio clínico
- Los niveles de CK19 no tienen relación con la presencia de receptores de estrógenos
- Los niveles de CK19 no tienen relación con los porcentajes de receptores de progesterona.
- Los niveles de CK19 no tienen relación con la presencia de receptores de Her2/neu
- El uso de multimarcadores para la detección de CTCs aumenta la probabilidad de detectar las células que hayan perdido algún marcador epitelial como consecuencia de la diseminación tumoral y a parte de servir como herramienta pronóstica, podría también definir las subpoblaciones de CTCs con gran capacidad invasiva y resistentes en función de los marcadores detectados.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Gómez Olivier, Carballido Rodriguez. Celulas Tumorales circulantes: aislamiento, cuantificación y relevancia de su traslación a la práctica asistencial. Actas Urol Esp. 2010; 34(1):3-5.
- 2) Barak V., Goike H., Panaretakis KW., Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. Clin Bichem 37 (2004) 529-540. Review.
- 3) Blazar R. Bruce, Taylor PA. Cells T Regulatory. Biol Blood and Marrow Transplant. 2005 II:46-49.
- 4) Anderson BO, Shyyan R, Eniu A, et al. "Breast Cancer in Limited-Resource Countries: An Overview of the Breast Health Global Initiative2005 Guidelines", The Breast Journal. 2006, 12(1):s3-15.
- 5) Noriega-Reyes MY,Langley McCarron E. Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. Cancerología 2008(3):29-40.
- 6) Molina ML, Reigosa A, Nobrega D, Molina Y. Receptores de Estrógeno y Progesterona en Cáncer de mama, asociación con variables clinicopatológicas. BMJ 2001; 314:1831-44.
- 7) Hayes DF, CristofanilliM, Budd GT. Circulating tumor cells at each follow-up time pointduring therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. Clin Cancer Res 2006;124218-4224.



- 8) Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V, Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. Clin Breast Cancer 2007;7:471-479.
- 9) Rack B, Schindlbeck C, Hofman S. Circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of primary breast cancer patients. Proc Am Soc Clin Oncol.2007;25 1654-1659.
- 10) Flores-Luna L., Salazar-Martínez E., Duarte-Torres RM., Torres-Mejía G., Alonso-Ruiz PA., Lazcano-Ponce E. Factores pronósticos relacionados con la supervivencia del cáncer de mama. Salud pública de México/ vol.50,no.2, marzo-abril 2008.
- 11) You F., Robers LA., Kang SP., Nunes RA., Dias C., Iglehat JD., Low- Level expression of HER2 and CK19 in normal peripheral blood mononuclear cells: relevance for detection of circulating tumor cells. J. Hematol Oncol. 2008 May 28;1:2.
- 12) Beaulieu N, Bloom D and Bloom R. "Breakaway: The global burden of cancer-challenges and opportunities", The Economist Intelligence Unit, The Economist. 2009.
- 13) Boyle P y Levin B. "World Cancer Report 2008", World Health Organization, International. Agency for Research on Cancer, Lyon.
- 14) Porter P, "Westernizing women's risk? Breast cancer in lower-income countries", The New England Journal of Medicine. 2008; 358: 213-216.
- 15) Knaul F, Bustreo F, Ha E y Langer A, "Cáncer de mama: ¿Por qué integrar la detección temprana con las intervenciones en salud reproductiva en países en vías de desarrollo?" Salud Pública de México, 2009. 1(2):220-227.

- 16) Jamison D, Breman J, Measham A, et al. "Disease Control Priorities in Developing Countries", Oxford University Press. 2006. 2nd. ed. New York.
- 17) Murray C and López AD, "The Global Burden of Disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020". 1996. Harvard University Press, Cambridge.
- 18) Knaul FM, López L, Lazcano E, "Cáncer de mama: un reto para la sociedad y los sistemas de salud", Salud Pública de México. 2009, 51;2:135-137.
- 19) Franco-Marina F, Lazcano-Ponce E and López-Carrillo L, "Mortalidad por cáncer de mama en México. Un análisis de edad-periodo-cohorte", Salud Pública de México. 2009, 51;2:157-164.
- 20) Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, et al. "Breast Cancer in Mexico: A Pressing Priority", Reproductive Health Matters. 2008, 16;32: 113-123.
- 21) Palacio-Mejía LS, Lazcano-Ponce E, Allen-Leigh B, et al. "Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006". Salud Pública de México. 2009, 51;2:208-219.
- 22) DeBruin LS and Josephy PD. Perspectives on the chemical etiology of breast cancer. Environ Health Perspect. 2002; 110;1:119-28.
- 23) Rodríguez S., Capurso Marino, Epidemiología del cáncer de mama. Ginecol obstet Mex. 2006 74; 585 – 93.

- 24) Rodríguez-Cuevas S, Guisa-Hohenstein F, Labastida-Almendaro S, et al. Breast Cancer Mammography Screening Program in Mexico: Initial Results 2005-2006. *Breast J.* 2009. 15(6):623-31.
- 25) Charpenter A and Aldaz M. The molecular basis of breast carcinogenesis. *The molecular basis of human cancer.* 2002. p. 347-363.
- 26) Secretaría de Salud. Compendio de cáncer. Registro histopatológico de neoplasias malignas 2002.
- 27) Brandon ME., y Villaseñor NC Detección del cáncer de mama: estado de la Mamografía en México. *Cancerologia* 1 (2006): 147-162.
- 28) Dehesa-Zentella A, Frías S, Galicia-Vázquez G, et al. Cáncer de glándula mamaria y metástasis: un creciente problema de salud pública en México. *Mensaje Bioquímico.* 2007: 31:172-195.
- 29) Schweizer J., Bowden PE., Coulombe PA., Langblein L., Lane B., et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J of Cell Biol,* vol.174,No. 2 July 17, 2006 169-174.
- 30) Bielsa S, Esquerda A, Salud A, Montes A, Arellano E, Rodríguez-Panadero F, Porcel JM. High levels of tumor markers in pleural fluid correlate with poor survival in patients with adenocarcinomatous or squamous malignant effusions. *Eur J Intern Med.* 2009 Jul;20(4):383-6. Epub 2008 Dec 21.
- 31) Markou A, Strati A Malamos N, Georgoulis V, Lianidou ES. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay. *Clin Chem* 2011 Mar;57(3):421-30.

- 32) Kim Seyun and Coulombe A. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes & Development* 2007 21:1581-1597 Review.
- 33) Tjensvoll K, Oltedal S, Farmen RK, Shammas FV, Heikkilä R, Kvaløy JT, Gilje B, Smaaland R, Nordgård O Disseminated tumor cells in bone marrow assessed by TWIST1, cytokeratin 19, and mammaglobin A mRNA predict clinical outcome in operable breast cancer patients. *Clin Breast Cancer*. 2010 Oct 1;10(5):378-84.
- 34) Brinkley BR, Beall PT, Wible LJ, et al. Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Res*. 40: 3118-3129.
- 35) Liska V, Holubec L Jr, Treska V, Vrzalova J, Skalicky T, Sutnar A, Kormunda S, Bruha J, Vycital O, Finek J, Pesta M, Pecen L, Topolcan O. Evaluation of tumour markers as differential diagnostic tool in patients with suspicion of liver metastases from breast cancer. *Anticancer Res*. 2011 Apr;31(4):1447-51.
- 36) Saloustros E, Mavroudis D. Cytokeratin 19-positive circulating tumor cells in early breast cancer prognosis. *Future Oncol*. 2010 Feb;6(2):209-16.
- 37) Alix.Panabieres C., VendrellJ.P., Slijper M., Pelle O., Barbotte E., Mercier G., Jacot W., Fabbro M., Pankel K. Full length cytokeratin-19 released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. *BCR* vol.11 No.3 R39.(2010).
- 38) Fisher CS, Cole DJ, Mitas M, Garrett-Meyer E, Metcalf JS, Gillanders WE, Mikhitarian K, et al. Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes fail to predict breast cancer recurrence: a final analysis of

prospective multi-institutional cohort study. *Ann Surg Oncol*. 2010 Oct; 17 Suppl 3:312-20.

- 39) Chen Y, Zou TN, Wu ZP, Zhou YC, Gu YL, Liu X, Jin CG, Wang XC. Detection of cytokeratin 19, human mammaglobin, and carcinoembryonic antigen-positive circulating tumor cells by three-marker reverse transcription-PCR assay and its relation to clinical outcome in early breast cancer. *Int J Biol Markers*. 2010 Apr-Jun;25(2):59-68.
- 40) Brinkley BR, Beall PT, Wible LJ, et al. Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Res*. 1980. 40: 3118-3129.
- 41) Huang SB, Bae JW, Lee HY, Kim Hy. Circulating Tumor Cells Detected by RT-PCR for CK-20 before surgery indicate Worse Prognostic Impact in Triple-Negative and HER Subtype Breast Cancer. *J Breast Cancer*; Mar;15(1):34-42, 2012.
- 42) Zhao S, Liu Y, Zhang Q, Li H, Zhang M, Ma W, Zhao W, Wang J, Yang M. The prognostic role of circulating tumor cells (CTCs) detected by RT-PCR in breast cancer: a meta-analysis of published literature. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Feb 11.
- 43) Alvarenga CA, Paravidino PI, Alvarenga M, Dufloth R, Gomes M, Zeferino LC, Schmitt F. Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol*. Jun; 64(6):493-7 2011,
- 44) Bambang IF, Lu D, Li H, Chiu LL, Lau QC, Koay E, Zhang D. Cytokeratin 19 regulates endoplasmic reticulum stress and inhibits ERp29 expression via p38 MAPK/XBP-1 signaling in breast cancer cells. *Exp Cell Res*. 2009 Jul 1;315(11):1964-74. Epub 2009 Mar .

- 45) Marrakchi R, Querhani S, Benammar S, Rouissi K, Bougatef K, Messai Y, Khadimallal, Rahal K. Detection of cytokeratin 19 mRNA and CYFRA21-1 (cytokeratin 19 fragments) in blood of Tunisian women with breast cancer. *Int J Biol Markers* 2008 Oct-Dec;23(4):238-43.
- 46) Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, Perraki M, Kalbakis K, Agelaki S, Stathopoulos EN, Chlouverakis G, Lianidou E, Kakolyris S, Georgoulas V, Mavroudis D. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *Clin Oncol*. 2009 May 1;27(13):2177-84. Epub 2009 Mar 30.
- 47) Siciliano MJ, Barker PE, and Cailleau R. Mutually exclusive genetic signatures of human breast tumor cell lines with a common chromosomal marker. *Cancer Res*. 1979. 39:919-922.
- 48) Cutress RI, McDowell A, Gabriel FG, Gill J, Jeffrey MJ, Agrawai A, Wise M, Raftery J, Cree IA, Yiangou C. Observational and cost analysis of the implementation of breast cancer sentinel node intraoperative molecular diagnosis. *J Clin Pathol*. 2010 Jun;63(6):522-9.
- 49) Daslakati A., Angelaki S., Perraki M., Apostolaki s., Xenidis N., Stathopoulos E., Kontopodis E., Detection of citokeratin-19 mRNA positive cells in the peripheral blood and bone marrow patients with operable breast cancer. *Br.J. Cancer* 2009 Aug; 18 101 (4); 589-97.
- 50) Effenberger KE, Borgen E, Eulenburg CZ, Bartkowiak K, Grosser A, Synnestvedt M, Kaaresen R. Detection and clinical relevance of early disseminated breast cancer cells depend on their cytokeratin expression pattern. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Feb; 125(3): 729-38.

- 51) Ignatiadis M, Georgoulas V, Mavroudis D. Micrometastatic disease in breast cancer: clinical implications. *Eur J cancer*. 2008 Dec;44(18) 2726-36. Review.
- 52) Wang L., Wang Y., Liu Y., Chang M., Wu Y., Wei H. Flow cytometry analysis of CK19 expression in the peripheral blood of breast carcinoma patients: relevance for circulating tumor cell detection. *J. Clin Cancer Res*. 2009 Apr 28; 28:57.
- 53) Zhang Q, Fan H, Shen J, et al. Human Breast Cancer Cell lines Co-Express Neuronal, Epithelial, and Melanocytic Differentiation markers in vitro and in vivo. *Plos one*. 2010;5(3):e9712.
- 54) Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, Chlouverakis G, Stathopoulos E. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 May 1;14(9): 2593-600.
- 55) Jeong H, Ryu YJ, An J, Lee Y, Kim A. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer correlates with high histological grade and triple-negative phenotype. *Histopathology*; Mar 22, doi; 10- 2012,
- 56) Kwon Y, Ro J, Kang HS, Kim SK, Hong EK, Khang SK, Gong G, Ro JY. Clinicopathological parameters and biological markers predicting non-sentinel node metastasis in sentinel node positive breast cancer patients. *Oncol Rep*. 2011 Apr;25(4):1063-71.
- 57) Lozano C. Capítulo Cáncer de mama. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima). Facultad de Medicina. Escuela Académico Profesional de Medicina Humana. Departamento Académico de Cirugía. Lima 1999.

- 58) Mc Pherson K, Steel C, Lianidou ES, Dixon JM. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000; 321: 624-628
- 59) Payne RE, Hava NL, Page K, Blighe K, Ward B, Slade M, Brown J, Guttery DS. The presence of disseminated tumour cells in the bone marrow is inversely related to circulating free DNA in plasma in breast cancer dormancy. *Br. J Cancer* Jan 17; 106(2):275-82.2012.
- 60) Pomier SJ, Quan GG, Christante D, Muller P, Newell AE, Olson SB, Diggs B, Muldoon L, Neuwelt E, Pommier RF. Characterizing the HER2/neu status and potential of breast cancer stem/progenitor cells. *Ann Surg Oncol*. 2010 Feb;17(2):613-23.
- 61) Reinholz MM., Kitzmann KA., Tenner K., Hillman D., Dueck AC., et al. Cytokeratin-19 and Mammaglobin Gene Expression in Circulating Tumor Cells from Metastatic Breast Cancer Treatment Group Trials, N0234/336/436/437. *Clinical Cancer Research*; 17(22); 7183-93
- 62) Sanisho L, Vertakova-Krakovska B, Kuliffay P, Brtko J, Galbava A, Galvavy S. Detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Endocr Regul*. Jul; 45(3):113-124. 2011.
- 63) San Miguel A, González B, García I, et al. Factores pronósticos del Cáncer de mama y el oncogen Her-2/Neu. *Rev. Electrón J Biomed* 2006. 72-88.
- 64) Veys I, Majjaj S, Salgado R, Noterman D, Schobbens JC, Manouach F, Bourgeois P, Nogaret JM, Larsimont D, Durbecq V.



Evaluation of the histological size of the sentinel lymph node metastases using RT-PCR assay: rapid tool to estimate the risk of non-sentinel lymph node invasion in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010, Dec;124(3):599-605.

- 65) Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AA, Pol RP, van Diest P, Snijders PJ, Meijer CJ. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer*. 2008 Jun 1;122(11):2562-7.
- 66) Bambang IF, Lee YK, Richardson DR, Zhang D. Endoplasmic reticulum protein 29 regulates epithelial cell integrity during the mesenchymal-epithelial transition in breast cancer cells. *Oncogene*, 2012, Apr,30;149.
- 67) Saloustros E, Mavroudis D. CTCs in Primary Breast Cancer (II). *Recent Results Cancer Res* 2012;195:187-92.
- 68) Payne RE, Hava NL, Page K, Blighe K, Ward B, Slade M, Brown J. The presence of disseminated tumor cells in the bone marrow inversely related to circulating free DNA in plasma in breast cancer dormancy. *Br.J.Cancer*. 2012. Jan,17:106 (2) 375-82.
- 69) Shimizu Y, Luk H, Horio D, Miron P, Griswold M, Iglehart D, Hdez B, Killen K. BRCA1- Iris Overexpression Promotes Formation of Aggressive Breast Cancer. *PloS One*, 2012,7(4);e34102.Epub 2012. Apr 12.
- 70) HeJ, Whelan SA, Lu M, Shen D, Chung DU, Saxton RE, Faull KF, Whitelegge JP, Chang HR. Proteomic-based biosignatures in breast cancer classification and prediction of therapeutic response. *Int. Proteomics*, 2011:Oct 24.}

- 71) Sharma D, Smits BM, Eichelberg MR, Meilahn AL, Muelbl MJ, Haag JD, Gould MN. Quantification of epithelial cell differentiation in mammary glands and carcinomas from DMBA- and MNU-exposed rats. *PLoS One*. 2011;6(10):e26145. Epub 2011 Oct 12.
- 72) Wallwiener CW, Wallwiener M, Kurth RR, Röhm C, Neubauer H, Banys MJ, Staebler A, Schönfisch B, Meuer SC, Giese T, Fehm TN. Molecular detection of breast cancer metastasis in sentinel lymph nodes by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR): identifying, evaluating and establishing multi-marker panels. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Dec;130(3):833-44. Epub 2011 Aug 21.
- 73) Sanislo L, Vertakova-Krakovska B, Kuliffay P, Brtko J, Galbava A, Galbavy S. Detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Endocr Regul*. 2011 Jul;45(3):113-24.
- 74) Kwon Y, Ro J, Kang HS, Kim SK, Hong EK, Khang SK, Gong G, Ro JY. Clinicopathological parameters and biological markers predicting non-sentinel node metastasis in sentinel node-positive breast cancer patients. *Oncol Rep*. 2011 Apr;25(4):1063-71. doi: 10.3892/or.2011.1157. Epub 2011 Jan 21.
- 75) Markou A, Strati A, Malamos N, Georgoulas V, Lianidou ES. Clin Chem. 2011 Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay. *Mar*;57(3):421-30. Epub 2011 Jan 18.
- 76) Alix-Panabieres C, Vendrell JP, Pelle O, Rebillard X, Riethdorf S, Muller V, Fabbro M, Pantel K. Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients. *Clin Chem* 2007;53:537-539.

- 77) Maass JD, Hoffmann-Fazel A, Goeroegh T, HoffmannM, Meyer JE, Gottschlixh S, Rudert H, Maune S: Cyfra 21-1: a serological help for detection of distant metastases in head and neck cancer. *Anticancer Res* 2000,20:2241-2243.
- 78) Sheard MA, Vojtesek B, Simickova M, Valik D. Release of cytokeratin-18 and -19 fragments (TPS and CYFRA 21-1) into the extracellular space during apoptosis. *J Cell Biochem* 2002, 85:670-677.
- 79) Slade MJ, Coombes RC. The clinical significance of disseminated tumor cells in breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4:30-41
- 80) Cristofanilli M, Broglio KR Guarneri V. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic straging beyond tumor burden. *Clin Breast Cancer* 2007;7:471-479.
- 81) Riethdorf S, Fritsche H, Muller V. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the Cell Search system. *Clin Cancer Res* 2007;13:920-928.
- 82) Gargano G, Agnese V, Calo V. Detection and quantification of mammaglobin in the blood of breast cáncer patients: can it be useful as a potential clinical marker? Preliminary results of a GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. *Ann Oncol* 2006; 17 (suppl.7):VII41-VII45.

- 83) McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J Clin Oncol* 2005; 23:9067-9072.
- 84) Zhou, Q., DM, Toivola N, Feng, HB, Greenberg, W.W., Frenke, and M.B. Omary. Keratin 20 helps maintain intermediate filament organization in intestinal epithelia. *Mol Biol Cell*. 2003; 14: 2959-2971.
- 85) Tong X, and Coulombe P.A. A novel mouse type I intermediate filament keratin 17n (K17n) exhibits preferred expression in nail tissue. *J. Invest Dermatol*. 2004; 122:965-970.
- 86) Coulombe PA, Omary MB. Hard and soft principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14:110-122.
- 87) Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002; 40:403-439.
- 88) Pujol JL, Grenier J, Daures JP, Daver A, Pujol H, Michel FB: Serum fragments of cytokeratin subunit 19 measured by CYFRA 21-1 immunoradiometric assay as a marker of lung cancer. *Cancer Res*. 1993; 53:61-66.
- 89) Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:329-340.

- 90) Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC., et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:793-802.
- 91) DePianto D, and Coulombe P.A. Intermediate filaments and tissue repair. *Exp Cell res.* 2004; 301:68-86.
- 92) De Jonghe P, Mersivanova I, Nelis E, Del Favero J, Martin J.J. Van Broeckhoven C., et al. Further evidence that neurofilament light chain gene mutations can cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Ann Neurol.* 2001; 49:245-249.
- 93) Coulombe P.A., Hutton M.E., Vassar R, and Fuchs E. A function for keratins and common thread among different types of epidermolysis bullosa simplex diseases. *J Cell Biol.* 1991b; 115:1661-1674.
- 94) Gilbert S, Loranger A, and Marceau N. Keratins modulate c-Flip/extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 antiapoptotic signaling in simple epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 2004; 24:7072-7081.
- 95) Fuchs E and Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science.* 1998; 279:514-519.
- 96) Fuchs E, and Weber K. Intermediate filaments: Structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:345-382.

- 97) Chang L, Shav-Tal Y, Trcek T, Singer RH and Goldman RD. Assembling an intermediate filament network by dynamic cotranslation J Cell Biol. 2006; 172:747-758.
- 98) Helfand BT Chang L and Goldman RD. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. J Cell Sci. 2004; 117:133-141.
- 99) Izawa I and Inagaki M. regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site-and phosphorylation state-specific antibodies. Cancer Sci. 2006; 97:167-174.
- 100) Lariviere RC and Julien JP. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. J Neurobiol. 2004;58:131-148
- 101) Hermann H, and Aebi U. Intermediate filaments: Molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. Annu Rev Biochem. 2004; 73:749-789

ANEXO 1



Fecha \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

No. De caso

CONSENTIMIENTO INFORMADO

YO

ESTOY ENTERADO(A) Y ACEPTO INGRESAR AL PROTOCOLO DETERMINACION DE CITOQUERATINA 19 (ck19) EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA SE ME HA EXPLICADO QUE SE ME TOMARÁ UNA PEQUEÑA MUESTRA DE SANGRE, SIN EXISTIR RIESGO PARA MI, MAYOR AL DE CUALQUIER TOMA DE MUESTRA SANGUÍNEA.

ASI MISMO ACEPTO QUE EL MÉDICO REVISE MI EXPEDIENTE PARA OBTENER DATOS ÚNICA Y EXCLUSIVAMENTE CON LOS FINES PARA ESTE ESTUDIO.

MI ATENCIÓN NO SE VERÁ AFECTADA INDEPENDIEMENTE DEL RESULTADO DE DICHA MUESTRA Y EN CASO DE REQUERIR INFORMACIÓN SOBRE EL RESULTADO, ESTE ME SERÁ PROPORCIONADO SIN NINGÚN COSTO, POR LA DRA. SONIA DEL CARMEN CHÁVEZ OCAÑA QUIEN SE ENCUENTRA EN EL ÁREA DE GENÉTICA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO EDUARDO LICEAGA.

\_\_\_\_\_  
FIRMA

\_\_\_\_\_  
TESTIGO

\_\_\_\_\_  
TESTIGO