



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

---

**MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *hMAM* EN LÍNEAS CELULARES  
DE CÁNCER DE MAMA SOMETIDAS A TAMOXIFEN Y 17 $\beta$ -ESTRADIOL**

**Walter Andrés Rincón Riveros**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNVERSIDAD NACIONAL (IBUN)  
BOGOTA, COLOMBIA  
2016**

**Modulación de la expresión del gen *hMAM* en líneas celulares de cáncer de  
mama sometidas a tamoxifen y 17 $\beta$ -estradiol**

**Walter Andrés Rincón Riveros**

Bacteriólogo, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Tesis de Maestría presentada como requisito parcial para optar al título:

**Magister en ciencias-Microbiología**

**Director: Victoria Eugenia Villegas Gálvez**

cPhD. M.Sc. Docente Principal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas  
Universidad del Rosario

**Codirector: Martha Raquel Fontanilla**

Ph.D. Profesor Titular, Departamento de Farmacia  
Universidad Nacional de Colombia

**Línea de investigación:**

Biología Celular

Grupo de investigación:

Ciencias Básicas Médicas

Universidad del Rosario

**Universidad Nacional de Colombia**

**Facultad de Ciencias**

**Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN)**

**Bogotá, Colombia**

**2016**

## **DEDICATORIA**

Para Nuestro Señor creador ser de luz que nos guía en cada instante de nuestras vidas.

Madre amada con tu ejemplo de lucha, perseverancia, respeto has orientado mi vida en el sentido correcto, solo agradecimientos por estar siempre incondicionalmente en cada mañana durante mi vida.

Abuela *Rosita* gran cabeza de nuestra familia, llenándonos la vida de paz y amor con esa sonrisa inigualable.

Hermanos, cada uno con su carácter ha contribuido a formar el mío.

Cindy, querida esposa, nuestro amor hace que las tormentas sean simples rocíos.

Y el ATP de mis días, María José, hija cada paso que doy es por ti y para ti, con tu amor puro e inocente le das sentido a mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A COLCIENCIAS y la Universidad del Rosario por la financiación de este proyecto.

A la Universidad Nacional de Colombia, donde soñé estudiar y hoy en día me he formado como Magister.

A mí querida profesora, Victoria Villegas quien cuando todo parecía gris, llego para ser el soporte incondicional de esta investigación.

A la Doctora Martha Raquel Fontanilla, por su tutoría y docencia en el posgrado.

A los Doctores Nelson Rangel y Milena Rondón, desde la distancia siempre estuvieron prestos a colaborarme desde el inicio de este estudio.

A Adriana Grismaldo por enseñarme a entablar una relación fraterna con los cultivos celulares.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad del Rosario, siempre atentos a cualquier consulta.

A la Dra. Yolanda Gómez por sus valiosas contribuciones desde el Laboratorio de Genética Animal de CORPOICA.

A todo el grupo del laboratorio de Ciencias Naturales por sus aportes al proyecto.

## RESUMEN

La función de la proteína mamoglobina (MAM) no se conoce con claridad a la fecha, se cree que juega un papel en el metabolismo esteroideo debido a que forma un complejo hidrofóbico en forma de bolsillo con otra uteroglobulina la lipofilina B (LIPB), este complejo podría estar implicado en el transporte de hormonas esteroideas como el estradiol y en este sentido estar asociado al análogo del estrógeno el Tamoxifen. Mediante ensayos *in vitro* utilizando líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, T47D, ZR75-1, BT474, JIMT-1) sometidas a tratamientos en tres tiempos con tamoxifen y 17B estradiol se investigó la posible modulación de la expresión de mamoglobina A y lipofilina B por estas sustancias. Nuestros hallazgos fueron que el tamoxifen ejerce una modulación negativa en líneas celulares RE+ HER- de los genes hMAM y LIPB y una regulación positiva en BT474 (RE+ HER+) de hMAM. Opuesto al tamoxifen el 17 B estradiol modula de forma positiva la expresión de hMAM en las líneas celulares con presencia de RE y HER2. Esto confirma que estos genes están regulados por las vías de señalización de los estrógenos y que estos genes varían su expresión en función de los RE y HER2.

Palabra Clave: hMAM, Lipofilina B, TAM, estradiol, cáncer de mama

## ABSTRAC

The function of the mammaglobin protein (MAM) is not clearly known nowadays, it is thought that it plays a role in the steroid metabolism because it forms a hydrophobic complex shaped as a pocket with another uteroglobulin the lipophilin B (LIPB), this complex could be involved in the steroid hormone transportation as the estradiol and in this way it is associated to the estrogen analogue, the Tamoxifen.

By test in vitro, using cellular cell lines of breast cancer (MCF-7, T47D, ZR75-1, BT474 and JIMT-1) it was subject to treatments done three times with Tamoxifen and 17 $\beta$  estradiol. It was investigated the possible modulation of the expression of mammaglobin and Lipophilin B by these substances. Our findings were that Tamoxifen has negative modulation cell lines ER+ HER- from the genes *hMAM* and *LIPB* and a positive regulation in BT474 (ER+ HER+) from *hMAM*. Opposite to Tamoxifen the 17 $\beta$  estradiol modulates in a positive way the expression of *hMAM* in the cell lines with the presence of ER and HER. It supports that these genes are regulated by the signal pathways of estrogen and that these genes vary their expression in function of the ER and HER.

Keywords: *hMAM*, Lipophilin B, TAM, estradiol, Breast cancer

## **TABLA DE CONTENIDO**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

### **3. OBJETIVOS**

**3.1. Objetivo general**

**3.2. Objetivos específicos**

### **4. JUSTIFICACIÓN**

### **5. ESTADO DEL ARTE**

**5.1. Mamoglobina**

**5.2. Lipofilina B**

**5.3. Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)**

**5.4. Receptor de hormonas**

### **6. MARCO TEORICO**

**6.1. Estrógenos endógenos**

**6.2. Cáncer de mama**

**6.2.1. Epidemiología**

**6.3. Factores de riesgo**

**6.3.1. Edad**

**6.3.2. Antecedentes de cáncer**

**6.3.3. Patologías benignas de mama**

**6.3.4. Antecedentes familiares**

**6.3.5. Predisposición genética**

**6.3.6. Exposición a hormonas endógenas y factores reproductivos**

**6.3.7. Menarquia**

**6.3.8. Menopausia**

**6.3.9. Terapia de remplazo hormonal**

**6.3.10. Paridad**

**6.3.11. Lactancia**

**6.3.12. Testosterona y estradiol**

**6.3.13. Hábitos de vida**

**6.3.14. Factores ambientales**

### **7. CLASIFICACIÓN DE CÁNCER DE SENO**

**7.1. Clasificación histológica**

**7.2. Clasificación molecular**

**7.2.1. Luminal A**

**7.2.2. Luminal B**

**7.2.3. Subtipo HER2 o HER2 enriquecido**

**7.2.4. Subtipo basal**

**8. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS**

**8.1. Autoexamen**

**8.2. Mamografía**

**8.3. Biopsia selectiva de ganglio centinela**

**8.4. Evaluación de la expresión de genes**

**9. TAMOXIFEN**

**9.1. Resistencia a la terapia endocrina**

**10. METODOS**

**10.1. Líneas celulares**

**10.2. Cultivo celular**

**10.3. Tratamiento de las líneas celulares con TAM y E2**

**10.4. qPCR**

**10.5. Tipo de estudio**

**10.6. Variables**

**10.7. Tratamiento estadístico de los resultados**

**11. RESULTADOS**

**11.1. Selección de los *housekeeping* o genes normalizadores**

**11.2. Estandarización de los fragmentos de *hMAM* y Lipofilina B**

**11.2.1. Diseño de *primers***

**11.2.2. Evaluación de *primers* en líneas celulares de Cáncer de Mama**

**11.2.3. Secuenciación de los fragmentos obtenidos**

**11.3. Evaluación de la expresión basal de *hMAM* y Lipofilina B en líneas celulares de cáncer de mama sin tratamientos.**

**11.4. Impacto del TAM en la expresión de *hMAM* y Lipofilina B**

**11.5. Impacto del E2 en la expresión de *hMAM* y lipofilina B**

**12. DISCUSIÓN**

**13. CONCLUSIONES**

**14. REFERENCIAS**

## **ABREVIATURAS (Español-Inglés)**

**AC:** Adenocarcinoma  
**ACTB:** Actina beta  
**ADN:** Acido deoxiribonucleico  
**ADNc:** Acido deoxirubonucleico copia  
**AKT o PKB:** Serina treonina kinasa  
**ATM:** Gen de ataxia telangiectasia  
**ATCC:** American Type Culture Collection  
**ASR:** Tasa estandarizada por edad  
**BU101:** Lipofilina B  
**BRCA:** Breast cancer gen 1 or 2  
**BCL2:** Protooncogén Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)  
**BSGC:** Biopsia selectiva de ganglio centinela  
**CK:** Citoqueratina  
**CCNB1:** Ciclina B1  
**CX3CL1:** Quimioquina C-X3-C Motif  
**CDI:** Carcinoma ductal infiltrante  
**CR:** Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast  
**CHEK2:** Enzima serina/treonina proteína kinasa CHK2  
**Ct:** threshold cycle  
**E2:** 17 $\beta$  estradiol  
**E3:** Estriol  
**ERE:** Elemento de respuesta a estrógenos  
**ECD-HER2:** Dominio extracelular del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico  
**ESR1:** Gen del receptor de estrógenos tipo 1  
**ELISA:** acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay  
**EP:** Efusión pleural  
**EGFR:** Receptor de factor de crecimiento epidérmico  
**FOX A1:** Proteina Forkhead Box A1  
**FDA:** Food and Drug Administration  
**FISH:** Hibridación fluorescente *in situ*  
**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
**GATA3:** GATA binding protein 3  
**GRB7:** Growth factor receptor-bound protein 7  
**HER2 o ErbB2:** Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico tipo  
**hMAM:** Gen de la mamoglobina humana A  
**IARC:** Agencia internacional para la investigación del cáncer  
**IHC:** Inmunohistoquímica  
**INC:** Instituto Nacional de Cancerología de Colombia

**Ki67:** Antígeno de proliferación Ki67  
**KRT:** Queratina  
**LIV-1:** Transportador de Zinc LIV-1  
**MWS:** Million Women Study  
**MAM:** Proteína mamoglobina humana A  
**mTOR:** Diana de rapamicina en células de mamífero  
**ROS:** Especies reactivas de oxígeno  
**RE:** Receptor de estrógeno  
**RP:** Receptor de progesterona  
**REs:** Receptores de estrógenos  
**OHPg:** Progesterona  
**PR-A o B:** Receptor de progesterona tipo A o B  
**PTEN:** Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa  
**PIP3:** Fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato  
**PI3K:** Fosfatidilinositol 3 Quinasa  
**PBS:** Buffer fosfato salino  
**pb:** Pares de base  
**q-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real  
**SERM o MSRE:** Modulador selectivo del receptor de estrógenos  
**SCGB2A1:** Gen de la proteína mamoglobina B  
**SHBG:** Globulina fijadora de hormonas sexuales  
**TAM:** Tamoxifen  
**TRAP100:** Proteína de unión al receptor de crecimiento 7  
**TRIM 29:** Tripartite motif-containing protein 29  
**TBP:** TATA box binding protein  
**WHI:** Women's Health Initiative

## Lista de figuras

- Figura 1. Estadísticas globales de cáncer
- Figura 2. Tendencias de la tasa de incidencia en el período 1973-2000
- Figura 3. Porcentaje de reducción de riesgo de por vida, asociado con el tiempo de lactancia materna. Relación dosis respuesta.
- Figura 4. Clasificación histológica de los tumores mamarios
- Figura 5. Estructura química de los principales moduladores selectivos del receptor de estrógeno.
- Figura 6. Expresión relativa de hMAM y Lipofilina B en líneas celulares de cáncer de mama con baja expresividad de genes estudio.
- Figura 7. Expresión relativa de hMAM y Lipofilina en líneas celulares de cáncer de mama con alta expresividad de genes estudio.
- Figura 8. Expresión relativa de lipofilina B después de tratamiento con TAM (1uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular MCF-7. CTRL (Control sin tratamiento)\*p= 0.05
- Figura 9. Expresión relativa de hMAM y lipofilina B después de tratamiento con TAM (1uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular T47D. CTRL (Control sin tratamiento)\*p= 0.05
- Figura 10. Expresión relativa de hMAM y lipofilina B después de tratamiento con TAM (1uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular ZR 75-1. CTRL (Control sin tratamiento)\*p= 0.05, \*\*p= 0,001
- Figura 11. Expresión relativa de hMAM y lipofilina B después de tratamiento con TAM (1uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular BT474. CTRL (Control sin tratamiento)\*p= 0.05,
- Figura 12. Expresión relativa de lipofilina B después de tratamiento con E2 (0,01uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular MCF-7. CTRL (Control sin tratamiento)\*p= 0.05
- Figura 13. Expresión relativa de hMAM y lipofilina B después de tratamiento con E2 (0,01uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular T47D. CTRL (Control sin tratamiento)\*p= 0.05, \*\*p= 0.001
- Figura 14. Expresión relativa de hMAM y lipofilina B después de tratamiento con E2 (0,01uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular ZR 75-1. CTRL (Control sin tratamiento)\*p= 0.05, \*\*p= 0.001
- Figura 15. Expresión relativa de hMAM y lipofilina B después de tratamiento con E2 (0,01uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular BT474. CTRL (Control sin tratamiento)\*p= 0.05

## **Listado de tablas**

Tabla 1. Funciones fisiológicas de los estrógenos.

Tabla 2. Mutaciones comunes en genes asociados con susceptibilidad a cáncer de mama.

Tabla 3. Aumento del riesgo de cáncer de mama, con relación a la duración de la terapia hormonal.

Tabla 4. Características de los subtipos moleculares de cáncer de mama.

Tabla 5. Pruebas basadas en firmas moleculares.

Tabla 6. Mecanismos de resistencia a la terapia endocrina.

Tabla 7. Características de las líneas celulares de Cáncer de mama que se usarán en el estudio.

Tabla 8. Primers evaluados para determinación de niveles de expresión de mamoglobina y lipofilina B.

Tabla 9. Panel de células seleccionadas para evaluar los patrones de expresión de los amplicones mamoglobina y lipofilina B.

Tabla 10. Patrones de expresión de Receptores hormonales, HER2, hMAM y Lipofilina B en líneas celulares de cáncer de mama (sin tratamiento)

Tabla 11. Expresión genes en estudio en líneas celulares de cáncer de mama después de tratamiento con E2 y TAM.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es un conjunto heterogéneo de enfermedades, con variadas características biológicas y manifestaciones clínicas diferentes (1).

En Colombia, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres seguido del cáncer de cuello uterino. Además, es la principal causa de muerte en mujeres de 15 a 54 años (2). En 2010, la incidencia de cáncer de mama en mujeres fue 18.1% (3). Esta enfermedad ha mostrado una alta morbilidad y está relacionada con una amplia variedad de factores de riesgo tales como la exposición a estrógenos y predisposición genética, entre otros (4).

Dentro de los estrógenos, el  $17\beta$ -estradiol (E2) es el esteroide ovárico circulante predominante en el cuerpo de la mujer, con aumentada actividad biológica en la glándula mamaria. Ésta hormona, desempeña un importante papel regulador en una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo: reproducción, diferenciación, proliferación celular, apoptosis, inflamación, metabolismo, homeostasis, función cerebral y el desarrollo de los senos durante la pubertad y la madurez sexual(5, 6).

La exposición prolongada a estrógenos representa un factor de riesgo importante en el desarrollo del cáncer de mama; sin embargo, los mecanismos utilizados por esta hormona para inducir cáncer son parcialmente conocidos. Adicionalmente, los estrógenos esteroideos han sido clasificados como cancerígenos después de la menopausia, por la Agencia Internacional para Investigación del Cáncer (IARC) (7); a pesar de lo mencionado, este es un tema muy controversial y no aceptado universalmente (8). Existen numerosos estudios que relacionan el cáncer de mama con tres factores: i) Exposición de las mujeres a estrógenos endógenos entre la menarquia y la llegada de la menopausia; ii) Aumento de producción de estrógenos en la obesidad (debido al aumento de la actividad de la aromatasa en el tejido adiposo); iii) La circulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) derivadas de la oxidación incompleta de los metabolitos de los estrógenos (9, 10). De ahí, la importancia de evaluar el papel de los estrógenos en la etiología de ésta enfermedad.

Un mecanismo propuesto para explicar por qué los estrógenos inducen cáncer es su unión al receptor nuclear específico, conocido como el receptor de estrógeno (RE). Esta interacción genera un potente estímulo para la proliferación celular de la glándula mamaria y aumenta el riesgo de mutación en el ADN durante la replicación celular (11-13).

En forma clásica la presencia de REs (REs+) y otros indicadores, como proteína *HER2*, ha sido utilizada para establecer diagnóstico clínico y pronóstico de la enfermedad y para seleccionar el tratamiento apropiado (14). El manejo terapéutico de los pacientes RE+ consiste en la aplicación de estrategias endocrinas que buscan bloquear éste receptor con el agente anti-estrogénico tamoxifen (TAM). TAM es una molécula antagonista de los estrógenos, clasificado como un modulador selectivo de los receptores de estrógeno (SERM), que actúa como una molécula antagonista de los estrógenos en el tejido mamario, retrasando la proliferación de células cancerosas. También, actúa como agonista de los estrógenos en el tejido óseo y cardíaco previniendo enfermedades coronarias y la osteoporosis (15).

La terapia endocrina del cáncer de mama con TAM o inhibidores de la aromatasa ha sido de gran aporte al tratamiento del mismo; en la actualidad, se encuentra reducida su eficacia por la resistencia intrínseca o adquirida que han venido desarrollando los pacientes frente al fármaco (16). Lo anterior es facilitado en parte, por la falta de comprensión sobre eventos moleculares de la respuesta a los fármacos, como alteraciones en la proliferación, apoptosis y microambiente tumoral, que afectan la efectividad de la quimioterapia. Por ésta razón, es necesario estudiar otros biomarcadores que puedan estar implicados en las vías moleculares que participan en el crecimiento tumoral, tratamiento y resistencia a la terapia (17, 18).

Un biomarcador muy promisorio en el estudio y tratamiento del cáncer de mama es el gen *hMAM*, que codifica para la proteína mamoglobina humana (*MAM*). Localizado en el cromosoma 11q13, *hMAM* tiene una longitud aproximada de 4500 pb y posee tres exones y dos intrones. Con 93 aminoácidos y 10.5 KDa, la proteína *MAM* pertenece a la familia de las secretoglobinas y su expresión ha sido identificada principalmente en el tejido mamario. En los últimos años, *MAM* ha sido propuesta como posible marcador de cáncer de mama, útil en el diagnóstico del cáncer de mama y en su pronóstico debido a su sobreexpresión en las células tumorales (19). Aunque su función aún no ha sido completamente dilucidada, se ha postulado que la familia de proteínas a la que pertenece está implicada tanto en la proliferación de linfocitos y la producción de interleucina 2 como en el metabolismo esteroideo, con la unión a moléculas aromáticas y bifenilos reducidos (20, 21), (22).

Otros integrantes de la familia de las secretoglobinas son la mamoglobina B, codificada por el gen *SCGB2A1* y con alta expresión en ovario, la lipofilina A y B, la proteína 10kDa de células de la clara y la proteína secretora inducible del

interferón gama. Los genes de las secretoglobinas forman un “cluster” denso en el cromosoma 11q12.2 e *in vivo* son de bajo peso molecular y pueden estar como homodímeros o heterodímeros (23). En mama la mamoglobina se encuentra formando un complejo con otra secretoglobina, lipofilina B (24), sin embargo, la función de este complejo en el tejido mamario sano y en el tumoral es completamente desconocida, siendo estos potenciales blancos en el estudio del cáncer de mama. Los tumores de mama muestran un amplio grado de heterogeneidad a nivel celular y molecular. Por este motivo, una buena caracterización del tumor contribuye a la elección de un tratamiento más adecuado para el paciente.

Existen reportes de estudios sobre el efecto molecular de agentes antitumorales en un gran número de tumores sólidos en los que se han utilizado líneas celulares expuestas a concentraciones crecientes de agentes antitumorales (25). Esta estrategia es sin duda una herramienta útil, pues permite obtener información acerca de los diversos procesos celulares que se encuentran alterados en los diferentes tipos de la enfermedad y que afectan la respuesta al tratamiento (26).

Considerando que la mamoglobina tiene alta expresión en tejido tumoral mamario y que el estrógeno es un potente inductor de la proliferación celular, en éste trabajo se evaluó si la expresión del gen *hMAM* en líneas celulares aisladas de tumores primarios de mama o de tumores metastásicos a tumores primarios de mama puede ser regulada por TAM y E2.

## 2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La expresión del gen *hMAM* puede ser regulada por TAM y E2 en líneas celulares de cáncer de mama cultivadas *in vitro*?

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del TAM y el E2 sobre la expresión del gen *hMAM*, en líneas celulares representativas de diferentes tipos de cáncer de mama.

### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Analizar si la expresión de los genes *hMAM* y lipofilina B es modificada por el tratamiento con TAM, en cinco líneas celulares de cáncer de mama.
- ✓ Analizar si la expresión de los genes *hMAM* y lipofilina B es modificada por el tratamiento con E2, en cinco líneas celulares de cáncer de mama.
- ✓ Establecer si TAM y E2 modifican la expresión de *hMAM* y lipofilina B diferencialmente de acuerdo con la presencia y/o ausencia de ERs y HER2, en cinco líneas celulares de cáncer de mama.

## 4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es el cáncer más común en las mujeres en el mundo. En Latinoamérica se considera un problema de salud pública, debido al incremento en su incidencia y en la tasa de mortalidad asociada (27). Este tipo de cáncer es una entidad patológica compleja y heterogénea, producto de la acción de factores ambientales, genéticos y moleculares, no todos bien identificados (28).

Uno de los problemas actuales relacionados con el tratamiento del cáncer de mama es que a pesar de que los pacientes inicialmente responden a la terapia, con el tiempo desarrollan resistencia a la misma, como es el caso del TAM (29, 30) (31). Considerando que la terapia con TAM puede durar hasta 10 años y que alrededor del 30% de los cánceres de mama RE+ son resistentes a TAM, es importante identificar marcadores moleculares que ayuden a monitorear la respuesta a tratamientos endocrinos. Conocer más de la resistencia a TAM ayudará al manejo racional de los fármacos utilizados en el tratamiento de cáncer de mama y al establecimiento de criterios de cambio a medicamentos como las aromatasas, que en Colombia son aproximadamente 8.2 veces más costosos (32).

Entre las características tumorales se encuentran la presencia de receptores para las hormonas sexuales (RE, RP), el tamaño del tumor, la presencia de tejido tumoral en los ganglios axilares y el grado histológico. De hecho, se ha propuesto una clasificación molecular fundamentada en la presencia y grado de expresión de marcadores moleculares, con el fin de personalizar el pronóstico y el tratamiento. Ejemplos característicos de esta clasificación molecular y tratamiento específico incluyen:

- ✓ Subtipo molecular Luminal A (RE+/RP+/HER2-). Este tipo de tumores representan hasta un 70% del total de tumores de mama y son considerados como de buen pronóstico. Pacientes con este tipo de cáncer son tratados con terapia endocrina, basados en medicamentos como TAM.
- ✓ Subtipo molecular HER2 enriquecido (RE-/RP-/HER2+). Este tipo tumoral (donde la proteína HER2 (p185) se encuentra sobreexpresada) representa el 15%-20% del total de tumores de mama y es considerado de mediano pronóstico (33, 34). La terapia usada para estos pacientes busca bloquear la acción del receptor HER2 con trastuzumab o pertuzamab.
- ✓ Subtipo molecular triple negativo (ER-/EP-/HER2-). Este tipo tumoral basa su diagnóstico en otros marcadores, como citoqueratinas, caveolinas y

receptores de crecimiento epidérmico (EGFR), y no en los marcadores clásicos y en la actualidad, no cuenta con una terapia dirigida establecida. Es un subtipo heterogéneo con 6 variables moleculares definibles, el pronóstico es malo, con respuestas al tratamiento que varían entre el 30% y el 45% y requiere más estudios para su entendimiento (35).

La clasificación tumoral descrita, fue la que nos llevó a incluir en éste trabajo líneas celulares representativas de algunos de los fenotipos moleculares arriba descritos. Aunque no hay evidencia de la expresión de MAM en todas ellas, la expresión de la proteína es diferencial de tejido mamario tumoral e indetectable en periferia de individuos sanos (36). De ahí, que los hallazgos de éste trabajo también contribuyan a una mejor caracterización de líneas celulares comúnmente empleadas para estudios in vitro de cáncer de mama.

## 5. ESTADO DEL ARTE

### 5.1 Mamoglobina

El estudio de la mamoglobina se inició en la década de los 90, cuando Mark A. Watson y Timothy P. Fleming, investigadores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Washington, identificaron cambios cuantitativos en la expresión de tejido tumoral de seno con respecto al tejido sano (37). Estos investigadores obtuvieron ADNc a partir de adenocarcinomas de seno y llamaron *mamoglobina A*, a la proteína expresada diferencialmente (38). Desde entonces, comenzó a postularse a la *mamoglobina A* como un posible marcador tumoral.

La mamoglobina A pertenece a la familia denominada uteroglobinas/Clara, proteínas secretadas por células epiteliales (secretoglobinas). Está constituida por 93 aminoácidos con dos puntos de N- glicosilación (23) y es traducida a partir de un ARNm de 503 pb (39). En 1998, Becker *et al.*, describieron una proteína homóloga a la que denominaron mamoglobina B, cuya expresión no fue detectada en tejido mamario (40). A finales de los 90, el gen de la *mamoglobina A* (*hMAM*) fue caracterizado y se estableció su localización en el cromosoma 11q13 (41). Ensayos de q-PCR e inmunotinciones permitieron identificar la presencia del ARN mensajero (ARNm) de *hMAM* hasta en un 60% de pacientes diagnosticados con cáncer de mama y de la proteína hasta en un 80% de tejidos tumorales (42).

Al inicio del siglo XXI aumentó la investigación sobre *MAM* y su utilidad como marcador de cáncer de mama. Fue entonces, cuando se reportó que los genes que codifican para las proteínas úteroglobinas están localizados en un *clúster* denso en el cromosoma 11. En 2002, Carter *et al.*, descubrieron que *MAM* forma un complejo que se une en forma covalente a la lipolifina B, otra proteína de la familia de las secretoglobinas; éste complejo tiene dos formas, una completamente glicosilada y otra de bajo peso molecular parcialmente glicosilada (22). En 2005, O'Brien *et al.*, mediante Western Blot detectaron dos isoformas de la proteína mamoglobina A *MAM*, una de 10,4 kDa, y otra de 10,1 kDa. La isoforma de mayor peso se coexpresa con el receptor hormonal ER, lo que parece estar asociado con un pronóstico favorable (43). En 2006, Bregni *et al.*, realizaron estudios con aspirados de médula ósea, provenientes de pacientes con neoplasias de epitelio mamario sometidas a resección completa del tumor o a cirugía más terapia neoadyuvante. Encontraron que *MAM* se expresa en las células metastásicas de seno infiltradas en médula ósea, lo que sugiere que su expresión puede ser considerada como marcador de enfermedad mínima residual; sin

embargo, concluyeron que era necesario realizar más estudios sobre este tema (44).

La investigación sobre la presencia de células micrometastásicas en sangre periférica ha cobrado mucho interés en la última década. Sin embargo, aún no se ha llegado a conclusiones definitivas acerca de la factibilidad de que la expresión de *MAM* pueda ser considerada como un factor pronóstico en el marco del tratamiento del cáncer. No existe unanimidad acerca de la frecuencia de la expresión de *hMAM* en sangre periférica en pacientes con cáncer de mama invasivo. Así, Ferro *et al.*, 2010 reportaron una frecuencia de 9% (45), Radwan *et al.*, 2013, de 50% (46) y Zehentner *et al.*, 2004 de hasta 68% (47), diferencias que pueden ser explicables con base en los tamaños de muestra y la metodología aplicada en cada trabajo.

Un avance importante en el estudio de *MAM* y del cáncer de mama fue el realizado por Zuo *et al.*, 2009, quienes hallaron que *MAM* no solo era una proteína de secreción sino que, además, estaba anclada a la superficie de las células tumorales, hecho que redireccionó el curso de la investigación sobre *MAM* y llevó a elevarla a la categoría de posible blanco terapéutico. Estos investigadores utilizaron anticuerpos anti-*MAM* contra un fragmento transmembranal del extremo N-terminal, el cual introdujeron en un sistema de liberación elaborado con partículas de LDL y doxorubicina cargada en su centro (*AntiMAM- LDL-DOX*). Ellos aplicaron este sistema a dos líneas celulares; una línea de células de cáncer de mama y otra de células endoteliales, usada como control. Los resultados obtenidos mostraron que el sistema *AntiMAM-LDL-Dox* no reconoció a *MAM* en las células endoteliales mientras que en la línea tumoral de mama, el sistema se unió a *MAM* en la membrana y produjo una citotoxicidad de 30 a 40% (48).

La función de la proteína no se conoce. Usando Northern blot y RT-PCR, se ha demostrado que la expresión de *MAM* está limitada a la glándula mamaria y que es posible identificar mayor cantidad de ARNm de *hMAM* en células tumorales de seno que en las células de tejido mamario sano (49). En este sentido, Sjödin *et al.*, 2008, encontraron que la expresión de *MAM* no tiene implicaciones en la tasa de crecimiento de líneas celulares de cáncer de seno; lo que indica, que es posible que esta proteína no intervenga en procesos de división celular (50). Por otra parte, Pattabiraman *et al.*, 2000, demostraron mediante análisis cristalográfico que el núcleo hidrófobo de *MAM* es capaz de unirse a moléculas similares a los esteroides, lo que sugiere un transporte hormonal por parte del complejo mamoglobina-Lipofilina B o que éste juega un papel de activación hormonal (51).

En Colombia, país en el que el cáncer de mama presenta una incidencia de más de 8000 casos al año y en el que la mortalidad por este tipo de cáncer es de más de 2000 casos anuales, se están realizando algunos estudios orientados a la búsqueda de posibles estrategias terapéuticas y diagnósticas de ésta enfermedad. En éste marco, Ramírez *et al.*, 2013, realizaron un estudio en pacientes con cáncer de mama para detectar MAM en suero con la técnica enzimática ELISA empleando anticuerpos anti-mamoglobina en conejos. Los datos obtenidos demostraron la presencia de ésta proteína en sangre periférica (52).

## 5.2 Lipofilina B

La lipofilina B (SCGB1D2, BU101) es una secretoglobina, familia constituida por 23 proteínas, de las cuales 8 han sido detectadas en humanos: mamoglobina A, mamoglobina B, lipofilina A, lipofilina C, la proteína 10kDa de las células clara, linfoglobina, lacriglobina y la proteína inducible del interferón gamma (23). La lipofilina B es codificada por un ARNm de 463 pares de bases, producido por un gen que hace parte del cluster localizado en el cromosoma 11q13, en el que se encuentran los demás genes de las secretoglobinas. El gen esta conformado por 3 exones y 3 intrones; mientras que la proteína madura y tiene una longitud de 90 aminoácidos y una masa de 9,9kDa (53).

Las secretoglobinas generalmente se asocian con epitelios secretores como los que recubren pulmones, glándulas salivales, glándulas sudoríparas, próstata y la glándula mamaria. Las proteínas maduras se secretan en péptidos globulares de bajo peso molecular y pueden estar en forma de homodímeros o heterodímeros; así, se han descrito heterodímeros de lipofilina A,C y de lipofilina B y *mamoglobina A* (22, 40).

Colpitts *et al.*, en el año 2001, encontraron que la lipofilina B forma un complejo con la *mamoglobina A* en tejido mamario. La sobreexpresión de lipofilina B, ha sido asociada con buen pronóstico en carcinomas ováricos (54). Una de las posibles funciones de las secretoglobinas es el transporte de pequeñas moléculas hidrófobas, como hormonas y feromonas, debido a su cavidad hidrófoba interna que puede albergar ligandos de tamaño medio como la progesterona (55).

## 5.3 Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (HER2)

En 1989, se encontró que *HER2* se expresaba en pacientes con cáncer de mama, mediante el análisis de infiltrados de ganglios linfáticos positivos para metástasis, que no se expresaba en pacientes con cáncer de mama con ganglios axilares negativos. Lo anterior, contribuyó a establecer a *HER2* como un marcador de

células tumorales de mama (56). Frank *et al.*, reportaron la sobreexpresión de *HER2* como factor de mal pronóstico en estadios avanzados de cáncer de mama y ovario (57). Reese *et al.*, informaron que el oncogén *HER2* se encuentra amplificado en un 25% a 30% de los casos de cáncer de mama, en un hecho que augura mal pronóstico y al parecer contribuye a la activación de vías de señalización que hasta ese momento eran poco conocidas (58). Por otro lado, un estudio con 315 pacientes que analizó el valor pronóstico de *HER2* y su asociación con otros factores pronósticos, encontró que en el 19% de los pacientes se expresaba *HER2*. Lo anterior fue asociado con una supervivencia global menor de cinco años, en comparación con los pacientes *HER2* negativo. Del total de pacientes analizados, 47 con ganglios axilares positivos fueron tratados con TAM y radioterapia y, en este caso, la supervivencia global fue del 13%. La conclusión de este estudio fue que el valor pronóstico de *HER2* no dependía de factores como edad, estado de los ganglios axilares, tamaño del tumor, grado histológico y estado de los receptores hormonales. Adicionalmente en cuanto al tratamiento, la terapia con TAM y radioterapia parecía ser insuficiente para erradicar los tumores con sobreexpresión de *HER2* (59).

En 2000, se llevó a cabo un estudio con el objetivo de conocer el valor predictivo de *HER2* y su posible asociación con mutaciones en p53, en pacientes con cáncer de mama de alto riesgo. El estudio concluyó que la sobreexpresión de *HER2* está asociada en forma significativa con el riesgo de recaída y muerte, pero no hallaron asociación con mutaciones en p53 (60).

Hayes *et al.*, 2001, evaluaron los niveles circulantes de *HER-2 (ECD-HER2)* en pacientes con cáncer de mama metastásico y determinaron que el 37% presentaba niveles elevados de *ECD-HER2*, hecho que asociaron con pronóstico desfavorable, mayor carga de la enfermedad y con historial de recaídas (61). Por su parte, Arpino *et al.*, (2004) mediante técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH), amplificaron los genes *HER1* y *HER2* en pacientes con cáncer de mama con receptor de estrógenos positivo ER+, en busca de una posible relación con la resistencia a TAM, como terapia endocrina. Encontraron que *HER2* medía la resistencia a TAM, pero solo en presencia de otros factores moleculares como *ALB-1* y *AKT* (62). Posteriormente, Massarweh *et al.*, 2008 sugirieron que la resistencia a la terapia con TAM está mediada por vías de señalización en las que intervienen las proteínas de la familia *HER*, lo que justificó el uso de inhibidores de estas vías para mejorar la terapia endocrina (63).

## 5.4 Receptores de hormonas

Desde la década de los 80, el estudio de los receptores para estrógenos y progesterona ha sido de gran interés en el contexto de la investigación sobre el cáncer de mama. La presencia del receptor de estrógenos en tejido tumoral se ha relacionado con un pronóstico favorable, teniendo en cuenta que los tumores tienen una baja tasa de proliferación celular y una buena diferenciación tumoral; características, que también han sido asociados con una buena respuesta a la terapia de tipo endocrino (64). A partir de 2000, y gracias al estudio desarrollado por Perou *et al.*, que estableció una nueva clasificación tumoral basada en el perfil molecular de la lesión, se cambió la percepción del diagnóstico y el tratamiento del cáncer mama. Mediante la técnica de microarreglos y con base en la obtención de patrones de expresión, se propusieron cuatro subtipos moleculares para clasificar los tumores mamarios: luminal A, luminal B, triple negativo y HER2 positivo (conocido también como HER2 enriquecido) (65).

En este mismo sentido, en 2003 Hirotaka *et al.*, evaluaron el receptor  $\alpha$  de estrógenos en tejido canceroso mamario y lograron establecer un punto de corte de la concentración de la proteína y su relación con un buen pronóstico de la enfermedad. Además, hallaron correlación entre la coexpresión del receptor de estrógenos (ER) con el receptor de progesterona (PR) como criterio de respuesta a la terapia endocrina, con una concordancia de 88% entre las dos pruebas (66).

Por su parte, en 2004 Hopp *et al.*, estudiaron la expresión del receptor de progesterona en sus isoformas A y B y su relación con la evolución clínica de la enfermedad. Demostraron que la presencia de este receptor es útil para predecir la respuesta a la terapia endocrina y el pronóstico de la enfermedad, lo que ha permitido establecer que, en pacientes con una relación RP-A y RP-B alta, existe más riesgo de recaída; lo cual sugiere el posible desarrollo de resistencia a TAM (67).

La introducción de la técnica de microarreglos combinada con inmunohistoquímica (IHC), contribuyó a establecer la existencia de perfiles de expresión diferenciales entre los tumores de mama, lo que demuestra la heterogeneidad de este cáncer (68). En este sentido, en 2007 Holst *et al.*, realizaron un estudio de microarreglos en la plataforma Affymetrix, que permitió identificar la amplificación del gen del receptor  $\alpha$  de estrógenos (*ESR1*). Éste estudio analizó 2000 muestras de tejido tumoral de mama, encontrando que el 20.6% expresa *ESR1* y que el 99% de éste último porcentaje, sobreexpresó el receptor. Adicionalmente, éste marcador fue detectado en lesiones benignas y precancerosas, sugiriendo que la expresión de

*ESR1* puede ser una vía común de enfermedad proliferativa del tejido mamario (69).

Se ha establecido que la progesterona (OHPg) y su receptor (RP) modulan positivamente la proteína del supresor de tumor fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), en líneas celulares de cáncer de mama; sugiriendo una posible conexión entre la progesterona y su receptor con supresores de tumor en el cáncer de mama (70). Los datos mencionados corroboraron los resultados obtenidos por Amorim *et al.*, 2010, quienes investigaron el papel de la progesterona en la modulación de proteínas quinasas en el sistema nervioso de ratas (71), hallando que PTEN actúa como supresor tumoral, debido a la defosforilación de fosfoinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), de modo que puede antagonizar la ruta de señalización PI3K-AKT/PKB y suprimir el ciclo celular (72).

## 6. MARCO TEORICO

### 6.1. Estrógenos endógenos

Los estrógenos son producidos de forma natural en el cuerpo de la mujer, en las mujeres premenopáusicas el  $17\beta$  estradiol (Estradiol o E2) es el estrógeno predominante en circulación, además de ser el estrógeno de mayor potencia hormonal por su afinidad con los receptores nucleares de estrógenos (REs). En mujeres premenopáusicas la concentración en suero de E2 oscila entre 200pg/mL y 400pg/mL en el ciclo menstrual, posteriormente en la menopausia los valores pueden ser menores de 20pg/mL. La estrona otro estrógeno tiene menos potencia que el estradiol siendo un metabolito de este, se produce a partir de la conversión en el tejido adiposo de la androstenediona. En las mujeres posmenopáusicas los ovarios dejan de producir estradiol, en cambio la glándula adrenal continua produciendo androstenediona que es el precursor de la estrona, es por esto que los niveles de estrona no varían en la menopausia y el estradiol cae drásticamente (73, 74). El tercer estrógeno endógeno es el estriol (E3), es un metabolito del estradiol en la periferia, es el principal estrógeno producido por la placenta durante la gestación pero es el de menor concentración en mujeres no embarazadas (75).

Los estrógenos son como todos los esteroides altamente solubles en lípidos y se difunden fácilmente a través de membranas celulares por el torrente sanguíneo, una vez llegan al órgano diana el estrógeno se difunde por la membrana celular uniéndose a receptores de estrógeno ya sea en la membrana o en el citoplasma y así viajar al núcleo donde se une a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el ADN e iniciar la transcripción génica (76), con múltiples funciones fisiológicas, como se resume en la tabla 1.

**Tabla 1. Funciones fisiológicas de los estrógenos (78).**

Blanco anatómico	Acción	Importancia
Tracto genital	Organogénesis femenina, estimula crecimiento de los músculos y del revestimiento epitelial del útero y de la vagina	Interviene en la regulación del ciclo menstrual en mujeres premenopáusicas
Glándula mamaria	Estimula la proliferación del tejido glandular y ductal de la mama y el crecimiento alveolar.	Desarrollo del tejido mamario en la pubertad, posterior a la menarquia.
Piel y músculo	Aumenta las concentraciones de ácido hialurónico, interviene en el metabolismo del colágeno y disminuye la proliferación epitelial	Disminución de estrógeno favorece el envejecimiento de la piel y atrofia el epitelio vaginal en mujeres posmenopáusicas
Hueso	Disminución de la reabsorción ósea y aumento de la densidad mineral en huesos.	Riesgo de osteoporosis
Hígado	Estimula la producción de la hormona sexual globulina vinculante (SHBG), aumenta concentraciones de sales biliares.	Unión de estrógenos a SHGB
Hemostasia	Estimula producción de factores de coagulación y adhesión plaquetaria, disminuye antitrombina III	Aumento de riesgo de eventos tromboticos.

## 6.2. Cáncer de mama

### 6.2.1 Epidemiología

El cáncer de mama es el tipo de tumor más frecuente en mujeres en todo el mundo, según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC). En su último boletín de 2012, la IARC reportó 1.671.149 casos nuevos de la enfermedad en el mundo, cifra que corresponde al 25% del total de casos de cáncer, sin tener en cuenta los cánceres de piel clasificados como de tipo no melanoma. En las regiones en vía de desarrollo, el total de casos llega a 883.000, cerca del 10% más del total de las regiones desarrolladas y constituye la causa de muerte por cáncer más frecuente, con 324.000 decesos, lo que corresponde al 14.3% del total de muertes por esta causa (77).

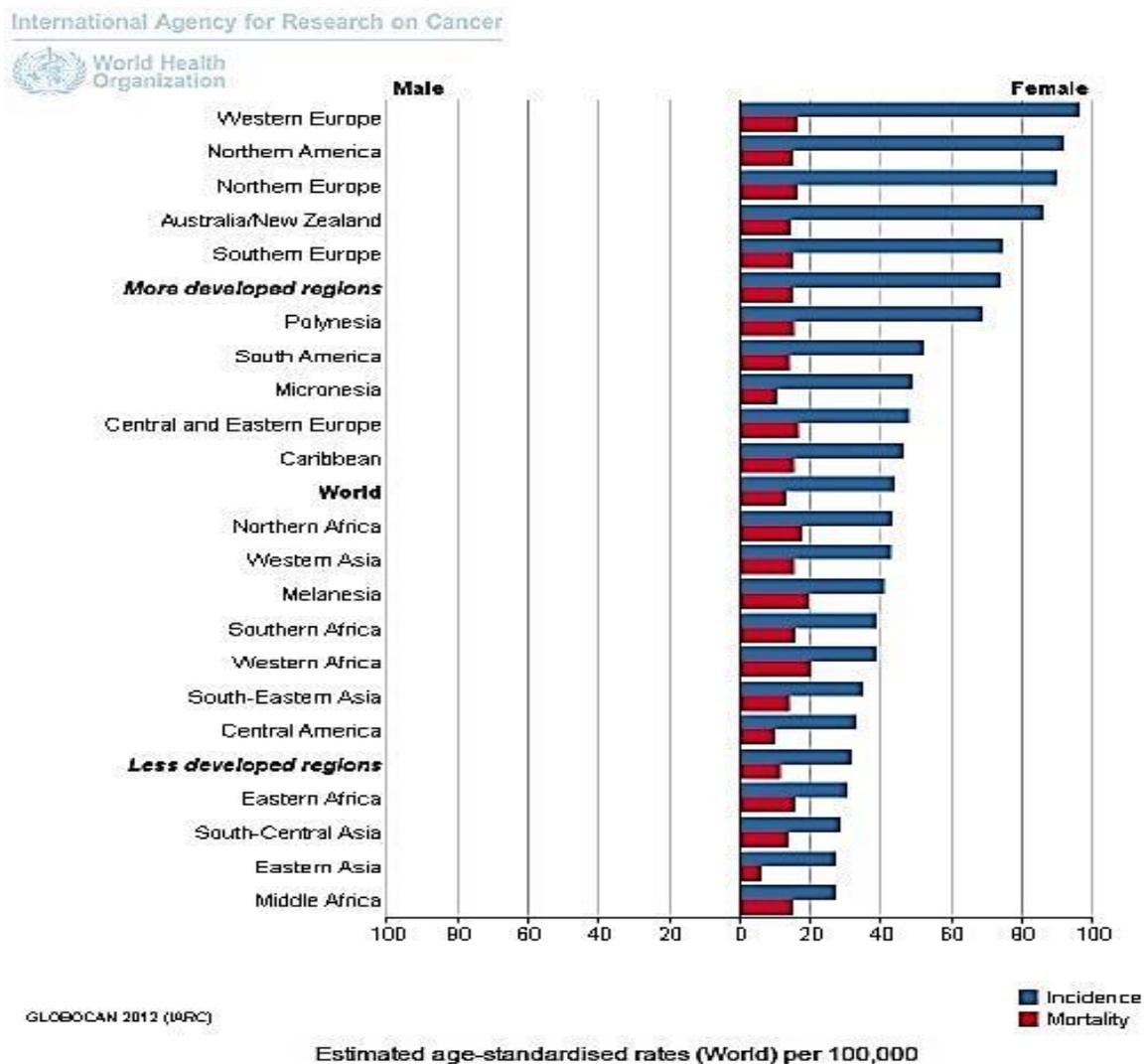
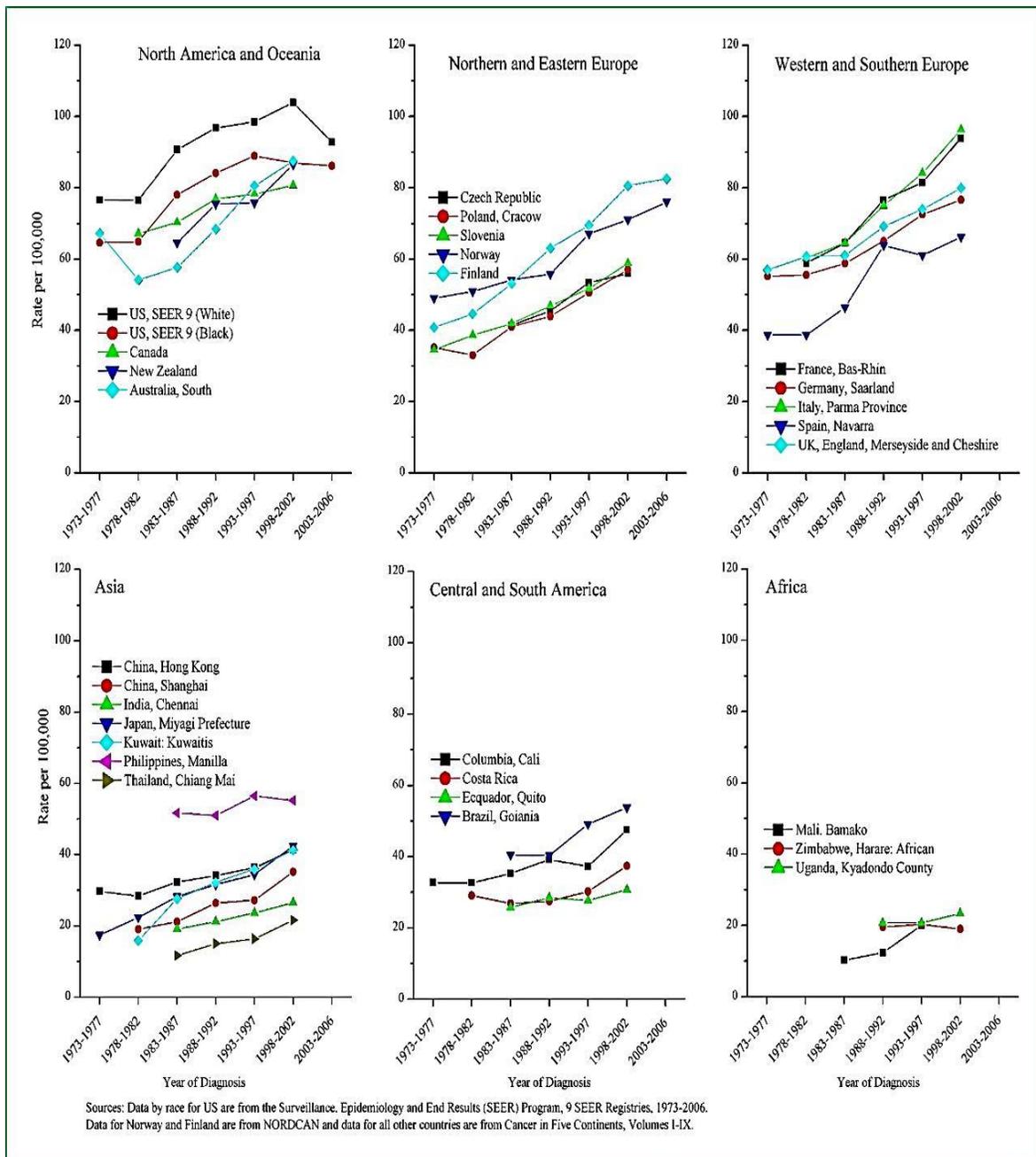


Figura 1. Estadísticas globales de cáncer (77).

Se estima que una de cada ocho mujeres está en riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de su vida. Sin embargo, existen variaciones en la tasa de incidencia de la enfermedad entre países, la cual obedece a factores reproductivos, hormonales y también al momento de detección. Las tasas de incidencia más elevadas se encuentran en Suiza, Italia y en mujeres de raza blanca de Estados Unidos. Por el contrario, las tasas más bajas están en África, Asia y Sudamérica como se puede observar en la figura 1 (78). Las tasas de incidencia elevadas de las regiones antes nombradas pueden ser explicadas en razón de la alta prevalencia de factores reproductivos asociados con un mayor riesgo de cáncer de mama, como menarquia temprana, maternidad tardía, embarazos únicos, uso de terapia hormonal en la menopausia, así como mayor índice de detección de la enfermedad mediante mamografía (79).

En Colombia, el Ministerio de Salud y Protección Social ha reportado 8.686 casos anuales de cáncer de mama, con una mortalidad anual de 2.649(80). El mayor riesgo de muerte por cáncer de mama se encuentra en las capitales departamentales como Santa Marta, Barranquilla, Cartagena, Medellín, Bucaramanga, Cali y Bogotá, lo que se explica por la mayor prevalencia de factores de riesgo de las mujeres residentes en zonas urbanas. En adición, las tasas más altas de mortalidad están en los tres departamentos del eje cafetero (Caldas, Quindío y Risaralda) y, además en San Andrés, Cundinamarca, Valle y Atlántico (81).

Colombia es un país con ingresos medios, que enfrenta al cáncer de seno como un problema emergente de salud pública. Las tasas anuales de mortalidad estandarizadas por edad (ASR) por esta causa aumentaron, de 12 por cada 100.000 personas en el periodo 1984-1988 a 14 por cada 100.000 personas, en el periodo 2004-2008. Además, la incidencia aumentó, de 27 ASR en el período 1962-1966, a 48 en 2003-2007, según el registro poblacional de cáncer de Cali, Valle del Cauca, Colombia como se muestra en la figura 2 (82, 83).



**Figura 2. Tendencias de la tasa de incidencia en el período 1973-2000 (84)**

Según el anuario del 2010 de Instituto Nacional de Cancerología de Colombia (INC), la distribución de casos nuevos de cáncer mama en mujeres fue 18,1%, representada por 670 casos del INC. De acuerdo con este estudio, los grupos etarios con mayor número de casos fueron los comprendidos entre los 45 y 49 años (110), 50 y 54 años (112) y 65 y 69 años (80). El 77,7% de los nuevos casos (521) correspondió al tipo carcinoma ductal infiltrante, mientras que el estado clínico más frecuente fue III-B, con 24,6% y tan solo el 3% fueron tumores *in situ*.

En 2010, en Bogotá DC, se presentaron 333 casos nuevos de cáncer de mama. En 2013, el número de muertes debidas a cáncer de seno en mujeres fue 115 (3) y el rango de edad con más casos correspondió a 45-54 años (40).

### **6.3. Factores de riesgo**

#### **6.3.1. Edad**

Según la Sociedad Americana de Cáncer, la probabilidad de que una mujer desarrolle cáncer durante su vida es 1:8, con una distribución por rangos etarios de 1:202 desde el nacimiento hasta los 39 años, de 1:26 entre los 40 y los 59 años y de 1:28 entre los 60 y los 69 años (85).

#### **6.3.2. Antecedentes de cáncer**

Las mujeres sobrevivientes de cáncer de mama tienen un alto riesgo de padecer un segundo cáncer de seno ipsilateral o contralateral, aún años después de haber sido diagnosticado el primero. De hecho, en pacientes sobrevivientes de cáncer de seno, el cáncer más común es el contralateral metacrónico. Los factores que favorecen un mayor riesgo de un segundo cáncer son: diagnóstico inicial de carcinoma ductal *in situ*, tumores en estadios IIB, cánceres ER- y diagnóstico en edad temprana (86).

#### **6.3.3. Patologías benignas de mama**

Las mujeres afectadas por la enfermedad proliferativa del seno tienen un riesgo de cáncer de seno 1,6% mayor que las mujeres sanas. Algunas de las entidades asociadas con esta enfermedad son: lesiones proliferativas sin atipia, hiperplasia ductal usual, papilomas intraductales, adenosis esclerosante y fibroadenomas, las cuales confieren un riesgo relativo bajo que puede aumentar según las características histológicas, la edad en la que se realizó la biopsia y los antecedentes familiares, los que potencian 1,5 a 2 veces más el riesgo de cáncer de seno (87). La hiperplasia ductal y la lobulillar, usualmente identificadas en la mamografía de tamizaje, confieren un riesgo de cáncer cinco veces mayor al de la población sana (88).

#### **6.3.4. Antecedentes familiares**

El riesgo de cáncer de mama aumenta en caso de historia familiar de la enfermedad. Estudios de seguimiento efectuados a 1,6 millones de personas durante un año, indican que una mujer a cuya madre o hermana se les haya

diagnosticado cáncer de mama antes de los 50 años, tiene un riesgo relativo ajustado de 1,69 y 1,66, respectivamente. Mientras que en la misma situación, pero con diagnóstico realizado después de los 50 años, el riesgo relativo ajustado es 1,37 y 1,52 respectivamente, en comparación con mujeres sin antecedentes familiares (89). En los países en los que cáncer de seno es común, como el Reino Unido, el riesgo de por vida con un familiar de primer grado con cáncer de seno es 5,5% y con dos familiares de primer grado es 13,3% (90).

### **6.3.5. Predisposición genética**

La predisposición genética de desarrollar una enfermedad está determinada por la heredabilidad de alteraciones o polimorfismos en el genoma. Así, se ha indicado que el 10% de los casos de cáncer de mama son de tipo heredofamiliar, pero no ha sido posible cuantificar la participación de los polimorfismos involucrados. Entre los factores de tipo heredofamiliar, se encuentran las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, las cuales confieren un alto riesgo, calculado entre 40% y 85% (91). Las mujeres que presentan estas mutaciones tienen un riesgo relativo mayor de desarrollar la enfermedad, entre 65% y 85% para *BRCA1*, y entre 45% y 85% para *BRCA2* (92). Mutaciones en los genes *ATM*, *CHEK2* y *PTEN* también confieren un riesgo entre 20% y 40%, a lo largo de la vida, existen una gran variedad de mutaciones que se han asociado al cáncer de mama como se muestra en la tabla 2 (93).



### **6.3.6. Exposición a hormonas endógenas y factores reproductivos**

Datos epidemiológicos, modelos animales y estudios *in vitro*, han demostrado que las hormonas reproductivas, principalmente los estrógenos, desempeñan un papel importante en la etiología del cáncer de mama. Aunque no ha sido completamente comprendida su participación en la enfermedad, existe evidencia de que los efectos de estas hormonas dependen de sus receptores: receptor de estrógeno (ER) y de progesterona (PR) los que, al parecer, median la proliferación de las células mamarias (94). Se ha establecido que los parámetros de supervivencia y respuesta a la terapia hormonal son más favorables en las mujeres que han sido diagnosticadas con tumores positivos para ER y PR, intermedios cuando los resultados son discordantes (ER+ PR-, ER- PR+) y menos favorables para los tumores negativos para ambos receptores(95).

### **6.3.7 Menarquia**

La producción de hormonas esteroideas ováricas se inicia alrededor de los nueve años, cerca de la menarquia y disminuye después de los 45, durante la menopausia (96). El lapso transcurrido entre estos dos eventos constituye el tiempo de exposición a hormonas esteroideas que la mujer tiene a lo largo de su vida. La menarquia en edades tempranas, antes de los 12 años, es un factor que aumenta el riesgo de la enfermedad, mientras que, cuando esta se retrasa dos años, el riesgo disminuye un 10% (97). Por otro lado, estudios prospectivos han mostrado que en las mujeres que tuvieron la menarquia antes de los 13 años, el riesgo de cáncer de seno aumenta casi al doble (98).

### **6.3.8 Menopausia**

El riesgo de cáncer de mama, de ovario y/o de útero aumenta cuando la menopausia se inicia después de los 55 años. Las mujeres postmenopáusicas tienen menos riesgo de la enfermedad que las mujeres premenopáusicas, lo que se debe a la reducción en la producción de hormonas en la postmenopausia. El riesgo aumenta casi en un 3%, por cada año de retraso en el inicio de la menopausia (natural o inducida por cirugía). Por tanto, las mujeres que llegan a esta etapa de su vida a los 55 años, tienen un riesgo 30% mayor de cáncer de seno, en comparación con aquellas que lo hacen a los 45 años (99).

### **6.3.9. Terapia de reemplazo hormonal**

Estudios como el *Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast* (CR) (100), la Iniciativa por la Salud de la Mujer (en inglés Women's Health Initiative (WHI))

(101) y el *Million Women Study* (MWS) (102) coinciden en afirmar que la terapia de reemplazo hormonal con base en estrógenos y progestágenos (E+P) es una causa establecida e importante de cáncer de seno. Los dos últimos estudios concluyeron que la terapia con estrógenos conjugados (ET) (Estrógenos equinos) también aumenta el riesgo de la enfermedad, aunque en menor grado que la terapia combinada (E+P). Sin embargo, mediante estudios aleatorios controlados con 16,608 mujeres, el WHI halló que aunque los ET no aumentan el riesgo de cáncer, es necesario efectuar más estudios sobre el tema (103).

El inicio a una edad temprana de la terapia de reemplazo hormonal y su duración confiere mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad, debido a que a un mayor tiempo de exposición a hormonas exógenas, aumenta el riesgo. Esto significa que las mujeres que inician la terapia de reemplazo hormonal más cerca de la menopausia tienen un riesgo más alto (104). El uso de terapia hormonal combinada confiere un riesgo 1,7 veces mayor de cáncer de mama, lo que incluye 2,7 veces más riesgo de carcinoma lobular invasivo, 1,5 veces más de carcinoma ductal invasivo y 2,0 veces más riesgo de cáncer ER+ y PR+. El uso prolongado de la terapia de reemplazo hormonal resulta en un mayor riesgo, de acuerdo con la duración de la terapia (Tabla 3).

**Tabla 3. Aumento del riesgo de cáncer de mama, con relación a la duración de la terapia hormonal (105).**

Tipo de cáncer / Tiempo de exposición	5.0 a 14.9 años	> 15 años
<b>Carcinoma ductal invasivo</b>	1,5 veces	1,6 veces
<b>Carcinoma lobular invasivo</b>	3,7 veces	2,6 veces

### 6.3.10. Paridad

La edad del primer embarazo y número de estos afecta el riesgo de desarrollar la enfermedad, de tal manera que las mujeres nulíparas tienen mayor riesgo de cáncer de mama, en comparación con las mujeres multíparas. Un primer parto a término, a corta edad, ejerce un efecto protector, mientras que el primer parto a una edad avanzada confiere un riesgo relativo mayor (106). Según los estudios realizados por el grupo de Vatten *et al* 1998, las mujeres que tienen su primer parto a los 30 años poseen el doble de riesgo de desarrollar cáncer de seno frente a aquellas mujeres que dan a luz a su primer hijo entre los 19 y 20 años (107). En cuanto al número de hijos, las mujeres que tenían un único hijo presentaban un

riesgo doble de tumores mamarios, en comparación con las que tenían hasta cuatro hijos (108).

### 6.3.11. Lactancia

La hipótesis de que la lactancia prolongada reduce el riesgo de desarrollar cáncer de mama ha sido investigada en mujeres premenopáusicas, mediante estudios epidemiológicos de casos y controles. Estos estudios demostraron que la lactancia prolongada tiene un efecto protector contra los procesos malignos mamarios (109, 110).

La lactancia materna retrasa los ciclos ovulatorios regulares y disminuye los niveles de hormonas sexuales endógenas. Se ha estimado que hay una reducción del riesgo de cáncer de mama hasta de 4,3%, por cada año de lactancia materna (111). Una investigación reciente realizada por De Silva *et al* 2010 (112), confirmó los hallazgos antes mencionados, mediante un estudio de dosis respuesta (Figura 3).

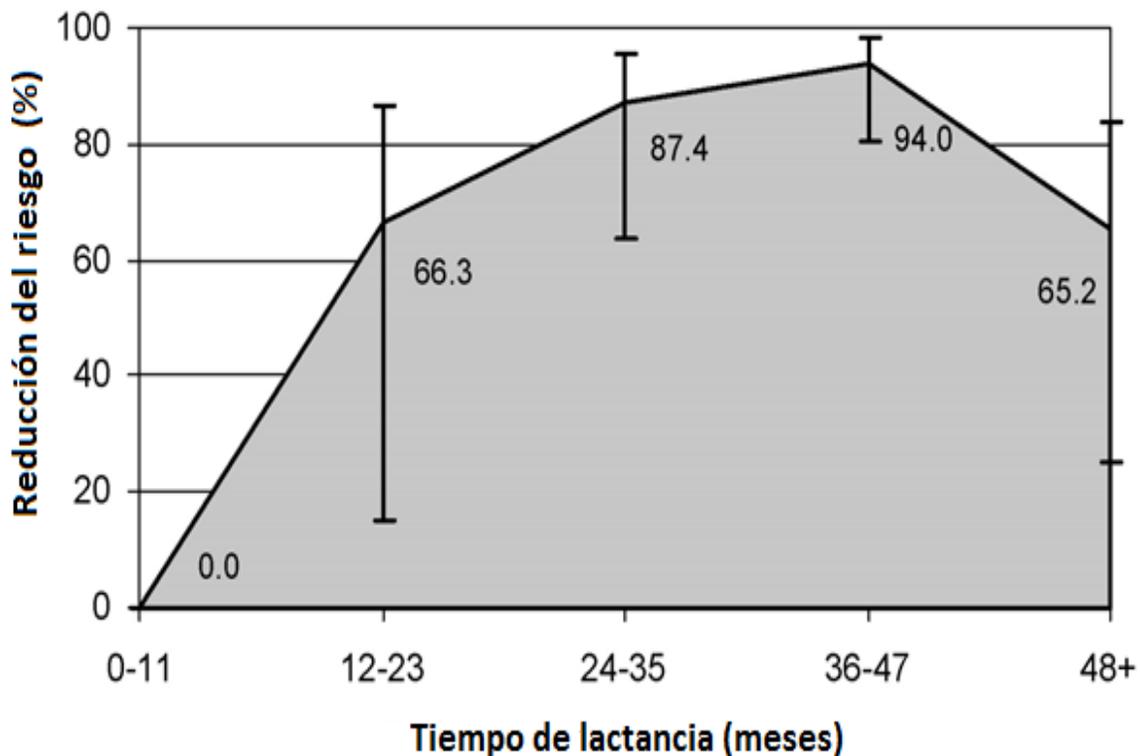


Figura 3. Porcentaje de reducción de riesgo de por vida, asociado con el tiempo de lactancia materna. Relación dosis respuesta (casos: controles=100:203). Tomado de De Silva *et al* 2010 (112).

### **6.3.12. Testosterona y estradiol**

Los niveles altos de hormonas sexuales endógenas aumentan el riesgo de cáncer de mama, hasta en 5,0% de riesgo relativo en mujeres premenopáusicas y postmenopáusicas (113). Elevados niveles circulantes de testosterona en las mujeres posmenopáusicas han sido relacionados con un mayor riesgo relativo de cáncer, entre 2,86% y 3,28% (114).

Los factores que afectan a los niveles circulantes de estradiol en mujeres posmenopáusicas son complejos. Sin embargo, los niveles de estrógenos endógenos son controlados por la acción de las enzimas implicadas en el metabolismo de los esteroides y, al parecer, la inactividad física y el aumento de índice masa corporal aumentan la producción de estrógenos. Otros factores como el origen étnico y ciertos polimorfismos genéticos, tienen una acción directa sobre el aumento de la actividad enzimática de los esteroides. Entonces, es necesario establecer medidas preventivas, como la adopción de hábitos de vida saludables y si se requiere intervención de las rutas involucradas en el metabolismo de hormonas esteroideas, siendo esta un área donde se debe profundizar estudios (115).

### **6.3.13. Hábitos de vida**

#### **Alcoholismo**

El consumo de alcohol está asociado con un mayor riesgo a desarrollar cáncer de mama, en cantidades de 5,0 a 9,9 gr por día, lo que equivale a 3 a 6 bebidas a la semana. El consumo excesivo en cualquier etapa de la vida está asociado con el desarrollo de cáncer de seno, el alcohol se considera un riesgo independiente a la enfermedad (116).

#### **Actividad física**

Se ha descrito que la actividad física frecuente puede reducir significativamente la mortalidad por cáncer de mama, hasta 42%, si se observa una guía estricta de actividad física. Por ende, tanto las mujeres con cáncer de seno como las sanas deben mantener un estilo de vida saludable que incluya actividad física rigurosa y además participar en programas de prevención y control del cáncer de seno (117).

#### **Obesidad**

La prevalencia de la obesidad está aumentando a un ritmo alarmante en el mundo, hasta el punto de alcanzar proporciones pandémicas. La evidencia epidemiológica

sugiere que los pacientes obesos diagnosticados con cáncer de mama tienen un peor pronóstico que los pacientes no obesos. Cerca de 43 estudios han demostrado una asociación entre la obesidad y la mortalidad al momento del diagnóstico, en la que los pacientes obesos tenían 33% más probabilidades de morir que los pacientes no obesos (118).

En el marco de los mecanismos que regulan la asociación entre el cáncer de seno y la obesidad participan procesos inflamatorios y angiogénicos, así como una secreción anormal de factores de crecimiento, como estrógenos y adipocinas (por ejemplo adiponectina y leptina) (119). Estudios en modelos murinos han corroborado los resultados obtenidos en humanos, en el sentido de que la obesidad acelera la carcinogénesis en tumores ER+ y de que altas cantidades de adipocinas y la activación de la vía de señalización PIK3/AKT/mTOR también aceleran su progresión (120).

#### **6.3.14. Factores ambientales**

##### **Radiación**

La exposición a la radiación proveniente de diversas fuentes, como la ionizante (radioterapia) o la nuclear, aumenta el riesgo de cáncer de seno. La radiación como tratamiento para algunos cánceres pediátricos aumenta el riesgo de cáncer de seno en forma lineal con relación a la dosis recibida (121). Los pacientes con linfoma Hodgkin tratados con radiación tienen un riesgo relativo de cáncer de seno igual a 7 (122). Vale la pena hacer notar que con posterioridad al ataque nuclear de Hiroshima y Nagasaki aumentó la incidencia del cáncer de seno en Japón, así como también en Bielorrusia y Ucrania, en las zonas aledañas a la planta nuclear de Chernóbil (123, 124).

## 7. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE SENO

### 7.1. Clasificación histológica

La clasificación histológica del cáncer de seno está fundamentada en patrones de crecimiento, morfología y grado de diferenciación. La figura 4 resume la clasificación de Malhotra *et al* 2010 (125)

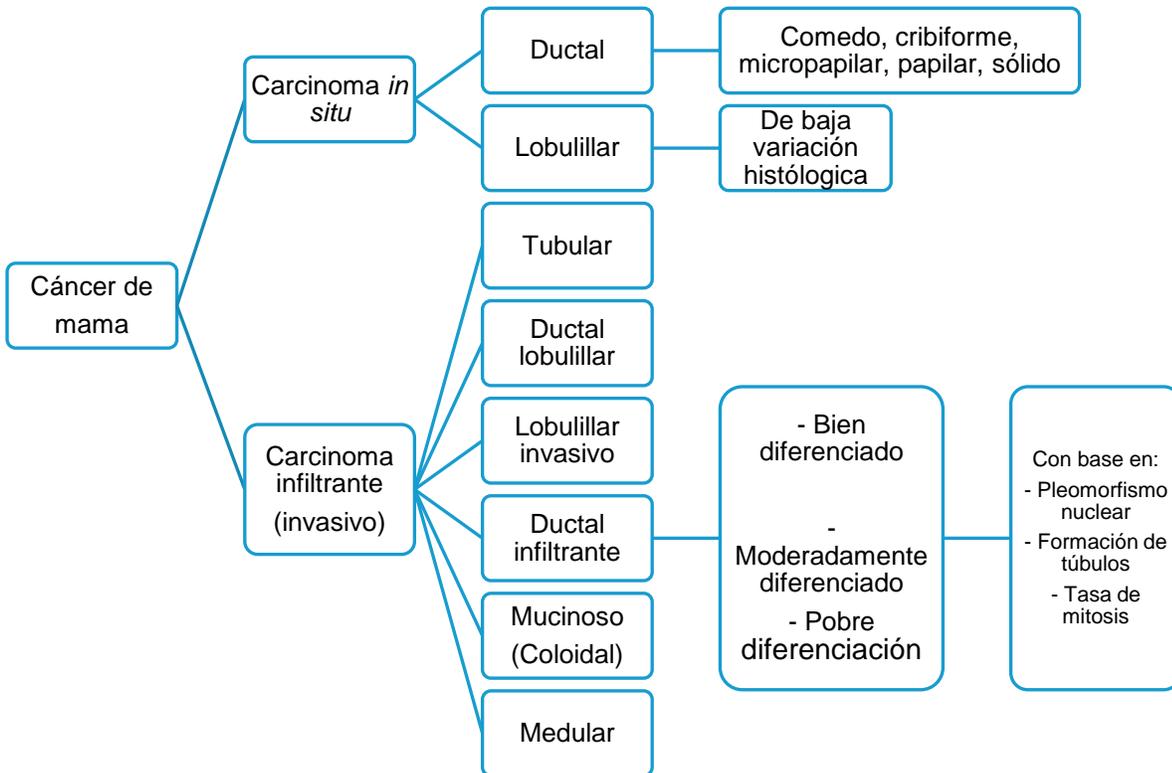


Figura 4. Clasificación histológica de los tumores mamarios

### 7.2. Clasificación molecular

El cáncer de seno es una enfermedad heterogénea, que abarca distintas entidades con variabilidad biológica, clínica y respuesta al tratamiento. La elección del tratamiento contra la enfermedad está fundamentada en gran medida en la información aportada por los parámetros clínicos, características patológicas, incluyendo las de tipo histológico, grado de desarrollo del tumor, presencia de infiltración linfovascular, presencia de receptores hormonales y estado del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (*HER2*)(126).

Cuatro principales tipos moleculares de cáncer han sido descritos con base en los perfiles de expresión génica. Fue así como el grupo de Perou (65) propuso una clasificación intrínseca, en la que el tipo basal está caracterizado por tumores ER-, PR- y HER2-, también conocido como *triple negativo*, mientras que el subtipo Luminal A, en su mayoría corresponde a tumores ER+, PR+, histológicamente de bajo grado. Por su parte, el subtipo Luminal B también en su mayoría corresponde a tumores RE+ y RP+, con la diferencia de que estos expresan bajos niveles de receptores de hormonas y son de alto grado histológico. El cuarto subtipo es el HER2+, que comprende tumores caracterizados por una alta amplificación y expresión del gen ErbB2 (gen que codifica para *HER2*)(Tabla 4)(127).

**Tabla 4. Características de los subtipos moleculares de cáncer de mama (128).**

	Luminal A	Luminal B	Triple negativo	HER2+
<b>Nivel de IHC</b>				
<b>ER</b>	+++	+	-	-
<b>PR</b>	++	+/-	-	-
<b>HER2</b>	-	-/+	-	+++
<b>Ki67%</b>	Baja (<14%)	Alta (>14%)	Alto	Alto
<b>Nivel de ARN</b>	Clúster de ER alto	Clúster bajo ER, alta proliferación	Firma alta proliferación	Firma basal, alta proliferación
<b>Mutación en el ADN</b>	PIK3CA (49%)	TP53 (32%); PIK3CA (32%)	TP53 (84%)	TP53 (75%); PIK3CA (42%)
<b>Ambiente inmune en el tumor</b>	Baja infiltración de linfocitos	Baja infiltración de linfocitos	Alta infiltración de linfocitos	Alta infiltración de linfocitos

IHC: inmunohistoquímica; Ki67: marcador nuclear de proliferación celular; PIK3CA: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-kinasa, subunidad catalítica alfa; +, positivo; -, negativo; +/- predominante negativo; +/-, predominio positivo

### 7.2.1. Luminal A

Este subtipo se caracteriza por la expresión del gen receptor de estrógenos (*ESR1*) y de otros genes como, *Bcl2*, *GATA 3*, *FOX A1* y *LIV 1*. En este subtipo no se observa expresión del gen *HER-2/neu*. Mediante IHC, estos tumores se caracterizan porque son ER+ y HER2-, así como positivos para citoqueratinas

luminales, como CK 8/18. Además, tienen una mayor expresión de PR y un bajo índice de proliferación y son morfológicamente bien diferenciados, en comparación con el subtipo luminal B. Estos tumores están asociados con una mayor supervivencia libre de recidiva y una mejor supervivencia global, además de expresar RP, el cual es un marcador de los tumores subtipo luminal A, lo que parece conferir un 20% de mayor supervivencia, con relación a los tumores de subtipo luminal B(129, 130)

Cerca del 60% de todos los tumores cancerosos de seno corresponden al subtipo Luminal A. Estos presentan la tasa de recidiva más baja (9% a cinco años), la tasa de supervivencia más alta (95%), el subtipo molecular de cáncer de seno de mejor pronóstico (131) . Como tratamiento de elección para este subtipo de tumores está recomendada la terapia hormonal (132).

### **7.2.2. Luminal B**

Las principales diferencias entre los subtipo Luminal A y B consisten en que los tumores subtipo Luminal A en su mayoría expresan genes relacionados con el ER, mientras que los del subtipo Luminal B expresan genes asociados con proliferación celular, como *CCNB1* (codificante de la ciclina 1), *MKI67* (o Ki67) y *MYBL2* (oncogén de la mieloblastosis) (133). Se ha establecido que la tasa de supervivencia del subtipo Luminal B a cinco años es 50% (131) también, puede compartir algunos rasgos del perfil molecular, tanto del subtipo luminal A como del subtipo triple negativo con la presencia de marcadores de proliferación como Ki67, de la survivina (inhibidor de la apoptosis) y de *CCNB1* y, finalmente comparte con el subtipo HER2 sobreexpresión de HER2 (134, 135).

En forma reciente, se ha descrito la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos tipo 1 en 16% a 27% de los tumores del subtipo Luminal B, lo que provoca mayor proliferación y resistencia a la terapia endocrina. Por tanto, comparados con el subtipo luminal A, los tumores subtipo Luminal B son de mal pronóstico (136).

### **7.2.3. Subtipo HER2 o HER2 enriquecido**

*HER2/neu* es un protooncogén localizado en el cromosoma 17q21, que codifica un receptor transmembranal de tipo tirosínquinasa (HER2 o p185). La formación de homodímeros o heterodímeros con otros miembros de la familia de receptores HER conduce a la activación de redes de proliferación y supervivencia celular(137).

El gen HER2 está sobreexpresado en cerca del 15% de los tumores de mama invasivo. Al analizar estos tumores mediante IHC, se ha determinado que más del 80% expresa HER2 3+. Los análisis genómicos de estos tumores muestran amplificación de genes relacionados con *Her2/neu*, como *GRB7* (codificante de la proteína de unión al receptor de crecimiento 7) y *TRAP 100* (proteína asociada al receptor de la hormona tiroidea), ambos ubicados en el cromosoma 17q12(138).

Este subtipo HER2 está asociado con una disminución de la supervivencia libre de enfermedad, con aumento en el riesgo de metástasis y con una supervivencia general más corta (139). Los tumores HER2+ al parecer tienen relación con la enfermedad multifocal/multicéntrica. Además, los ganglios axilares son positivos y la afectación ganglionar es de alto volumen, en comparación con el subtipo luminal A (140). Clínicamente, estos tumores se comportan de una forma agresiva, pero los avances en la aplicación de terapias dirigidas contra HER2, como el *Trastuzumab*, han mejorado la supervivencia de los pacientes. Este subtipo también tiene una mejor respuesta a la terapia neoadyuvante, en comparación con los subtipos luminales.

Después de la cirugía conservadora de seno, las recidivas locales son más comunes en tumores HER2/neu positivos: aproximadamente del 8%, comparadas con el subtipo luminal A. En adición, junto con el subtipo Basal, tiene las tasas de supervivencia libre de recidiva más bajas. También, se ha observado que las metástasis más frecuentes a hígado y hueso provienen de tumores HER2/neu positivos.

#### **7.2.4. Subtipo Basal**

El fenotipo basal se caracteriza por la falta de expresión de los receptores de estrógeno y los genes relacionados con *HER2/neu*, aunque muestra una mayor expresión de *KRT5* (*queratina 5*), *KRT17*(*Queratina 17*), *CX3CL1*(*Quimioquina (C-X3-C Motif) Ligando 1*, *Anexina 8* y *TRIM 29*(*Tripartite motif-containing protein 29*). Como su nombre lo indica, se caracteriza porque hay una mayor expresión de citoqueratinas de células basales o mioepiteliales. También se he descrito un aumento en la expresión del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y una alta tasa de mutación en el gen p53. Mediante IHC, se ha establecido que estos tumores son negativos para RE, RP y HER2 y que las citoqueratinas basales CK5/6, CK17 y CK19 permiten identificar este subtipo de tumores(141, 142)

## **8. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS**

### **8.1. Autoexamen**

Consiste en la inspección y exploración manual de la glándula mamaria mediante la palpación, con el fin de percibir alguna alteración en el tejido mamario.

La autoexploración mamaria se recomienda a partir de los 20 años, pues posee un valor extraordinario teniendo en cuenta que constituye el primer recurso con que cuentan las mujeres para diagnosticar en forma temprana algunos procesos patológicos de la glándula mamaria. La autoexploración comprende dos pasos básicos:(143)

- ✓ Inspección: Consiste en observar el aspecto externo de los senos.
- ✓ Palpación: Permite descubrir bultos anormales o nódulos.

## **8.2. Mamografía**

La mamografía de cribado es la principal herramienta para la detección temprana del cáncer de mama y la reducción de la mortalidad por esta patología(144). Según la evidencia científica disponible, la reducción en la mortalidad gracias a la detección precoz mediante mamografía es de 22% en mujeres de 50 a 59 años y de 15% en mujeres de 40 a 49 años, con una tendencia a aumentar a medida que se prolonga el seguimiento(145).

## **8.3. Biopsia selectiva de ganglio centinela**

La biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC) es una técnica estándar en la estadificación de la metástasis del cáncer de mama sin evidencia de afectación axilar. Su limitación es la aparición de falsos negativos que podrían ser causados por bloqueo linfático tumoral del ganglio centinela y captación en los linfáticos vecinos. Los ganglios centinelas infiltrados suelen aumentar de tamaño y consistencia, por lo que pueden ser detectados mediante una palpación intraoperatoria sin que capten el radiotrazador (146)

## **8.4. Evaluación de la expresión de genes**

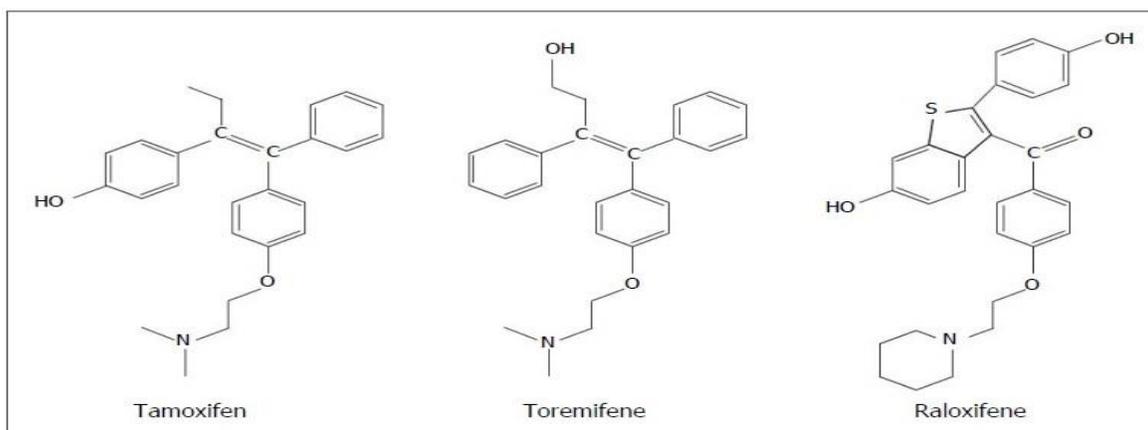
La medicina molecular está explorando nuevos descubrimientos para el diagnóstico del cáncer, con base en patrones genómicos y proteómicos, con el fin de establecer nuevos marcadores que lleguen a mejorar la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico y así obtener una mejor respuesta al tratamiento. En la actualidad, existen varias pruebas disponibles en forma comercial que permiten evaluar la expresión de perfiles moleculares (Tabla 5).

Tabla 5. Pruebas basadas en firmas moleculares (150).

Prueba	Referencia	Compañía	Muestra utilizada	Técnica
<b>MammaPrint®</b> (aprobado por la FDA)	van't Veer LJ <i>et al</i> , Nature 2002	Agencia BV, (Ámsterdam, Países Bajos)	Tejido fresco, para conservar el ARN	Expresión de perfiles de genes por Microarrays
<b>Oncotype DX®</b>	Paik S <i>et al</i> , N Engl J Med 2004	Genomic Health Inc. (Redwood City, CA, EE.UU.)	Tejido fresco congelado o parafinados	QRT-PCR (21 genes)
<b>Theros-Breast Cancer Gene Expression Ratio Assay®</b>	Ma XJ <i>et al</i> , Cancer Cell 2004	BioTheragnostics (Biomérieux Alianza Groupe, San Diego, EE.UU.)	Tejido fresco congelado o parafinados	QRT-PCR (3 genes)
<b>PAM50/Breast BioClassifier™</b>	Parker JS <i>et al</i> , J Clin Oncol 2009	University Genomics, Inc./ARUP Laboratories	Tejido fresco congelado o parafinados	QRT-PCR (55 genes)
<b>MapQuant Dx™</b>	Sotiriou C <i>et al</i> , J Natl Cancer Inst 2006 and Toussaint J <i>et al</i> , BMC Genom 2009	Ipsogen (Breast Cancer Profiler)	Tejido fresco congelado o parafinados	QRT-PCR (8 genes)
<b>Mammostrat®</b>	Ring BZ <i>et al</i> , JCO 2006	Applied Genomics, Inc., (Huntsville, Alabama)	Tejido fresco congelado o parafinados	IHC, 5 proteínas por anticuerpos monoclonales

## 9. TAMOXIFEN

TAM es un compuesto no esteroideo, el 4-hidroxitamoxifen su forma más potente, este presenta propiedades de agonista y antagonista dependiendo su órgano de acción, es denominado modulador selectivo del receptor de estrógenos (MSRE) (147). TAM es un fármaco ampliamente usado en la terapia endocrina del cáncer de seno en el mundo, tanto en mujeres premenopáusicas como posmenopáusicas y en la actualidad es considerado el MSRE de elección (Figura 5). TAM fue estudiado inicialmente como un fármaco anticonceptivo, este fármaco actúa en el hígado, útero y hueso como agonista no esteroideo, pero, en la glándula mamaria y en el cerebro es un inhibidor competitivo por el receptor de estrógeno (148). En la glándula mamaria, TAM bloquea selectivamente la señalización celular a nivel del RE inhibiendo la proliferación de células ductales. TAM es hidroxilado por el sistema enzimático citocromo P450 en 4-hidroxitamoxifen (4HT) y metabolizado en el hígado. Otro metabolito de TAM que es oxidado por el complejo citocromo P450 es el endoxifen (4-hidroxi-N-demetil-tamoxifen) los metabolitos mencionados son los más potentes que se derivan del metabolismo del TAM y exhiben una alta afinidad de unión al RE e inhiben la proliferación tumoral (149).



**Figura 5. Estructura química de los principales moduladores selectivos del receptor de estrógeno (149).**

### 9.1. Resistencia a la terapia endocrina.

Se han descrito varios mecanismos por los cuales hay falla en la terapia endocrina con TAM, las más estudiadas se describen en la tabla 6.

**Tabla 6. Mecanismos de resistencia a la terapia endocrina.**

Mecanismo de resistencia	Causa
<b>Farmacogenéticos</b>	El complejo citocromo P450 es fundamental para la producción del metabolito endoxifen, polimorfismos de nucleótido simple SNP o la ingesta de otros medicamentos pueden alterar parcialmente o definitivamente la actividad de esta enzima y por ende la terapia endocrina. Algunos de los medicamentos de reacción cruzada son el Quindine, Paroxetine, Amiodarona y citalopram entre otros(154-156).
<b>Perdida o modificación de la expresión de RE</b>	Cambios epigenéticos como metilación aberrante del promotor del RE, desacetilación de histonas lo que conlleva a una súper condensación del nucleosoma y limita la transcripción(157). Mutaciones en el gen ESR produciendo un fenotipo RE-(158).
	Co tratamientos con inhibidores de la ADN metiltransferasa-1 (DNMT-1), tales como 5Aza-2-desoxicitidina (AZA) o inhibidores de la histonadesacetilasa (HDAC), Tricostatina A (TSA) y el ácido hidroxámico suberoilamida (SAHA) pueden inducir una expresión RE-(157, 159).
<b>Alteración de la proteínas coreguladoras</b>	Fosforilación de RE o de sus reguladores por las proteínas quinasas A (PKA), proteína quinasa activadora de mitógenos (MAPK) y serina/treonina proteína quinasa-1 (PAK-1)(160, 161).
	La transcripción de RE está regulada por corepresores o coactivadores, con la unión de TAM a RE son reclutados corepresores que alteran la acción en el gen diana, un ejemplo claro es una expresión alta ErbB2/HER-2 en pacientes con terapia endocrina con TAM la supervivencia libre de enfermedad disminuye(162). Niveles bajos del corepresor 1 del receptor nuclear (NCoR1) predice mala respuesta a TAM(163).
<b>HER-2</b>	Sobreexpresión de ErbB2/HER-2 está asociado a respuesta reducida a la terapia hormonal, Gefitinib un inhibidor de HER-2 aumenta la respuesta antitumoral de TAM(164).
<b>Vía PI3K/AKT</b>	PI3K es un sistema de activación de señales clave que une oncogenes y múltiples clases de receptores y una de las principales vías de resistencia hormonal, sobreexpresión de HER-2 o el receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-1R) o pérdida de fosfata de inositol fosfato 4B (INPPB4) activan la vía PI3K confieren

## 10. METODOS

Se evaluaron cinco líneas celulares caracterizadas por presentar tres tipos de cáncer de mama: MCF-7, T47D y ZR75-1 (Luminal A - RE+/HER2-), BT474 (Luminal B - RE+/HER2+) y JIMT-1 (HER2 enriquecido, RE-/HER2+) las cuales fueron cultivadas en presencia y ausencia de E2 (E2758 Sigma) y TAM (T5648 Sigma) a una concentración final de 0,01 $\mu$ M y 1 $\mu$ M respectivamente. Estas concentraciones fueron previamente estandarizadas por el grupo de investigación en un estudio donde fueron utilizadas las mismas líneas celulares. Se cuantificó la expresión de los genes de Mamoglobina y Lipofilina B a diferentes tiempos de incubación, mediante la técnica de q-PCR. Se realizaron dos ensayos por experimento y triplicados de las pruebas de q-PCR.

### 10.1. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en el estudio, MCF-7, BT474, TD47D, ZR75-1 y JIMT-1, fueron obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110 USA) unas como parte de la colección que tiene la Universidad del Rosario y otras donadas por el laboratorio de Patología del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Torino, Italia. La Información específica de las líneas celulares estudiadas es indicada en la tabla 7.

**Tabla 7. Características de las líneas celulares de Cáncer de mama que se usarán en el estudio.**

Línea Celular	Número ATCC <sup>®</sup>	Pase TAM	Pase E2	Receptores Hormonales	Estado del gen <i>HER2</i>	Tejido Origen	Tipo de tumor	Edad del Paciente
<b>BT474</b>	<b>HTB-20<sup>TM</sup></b>		P17	ER $\alpha$ +	A	CDI	CDI	60
<b>MCF-7</b>	<b>HTB-22<sup>TM</sup></b>	7	P9	RE+ / RP+	NA	EP	AC	69
<b>ZR75-1</b>	<b>HTB-CRL-1500<sup>TM</sup></b>	23	38	RE+/PR-/+	NA		CDI	63
<b>T47D</b>	<b>HTB-133<sup>TM</sup></b>		35	ER+/PR+	NA	EP	CDI	54
<b>JIMT1</b>	<b>ACC 589</b>		30	ER-/PR-	A	EP	CDI	62

A, Amplificado; NA, No Amplificado; AC, adenocarcinoma; EP, efusión pleural; T, tumoral; CDI, carcinoma ductal infiltrante; CM, carcinoma medular; P, número de pase. Condiciones del medio: SFB, suero fetal bovino. Las líneas celulares serán

mantenidas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en el medio indicado.

## **10.2. Cultivo celular**

Todas las líneas celulares incluidas en el estudio fueron cultivadas en medio DMEM enriquecido al 10% con suero fetal bovino (SFB), solución de antibiótico-antimicótico (1X) y L-glutamina (2mM). Estos cultivos fueron mantenidos en incubadora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

## **10.3. Tratamiento de las líneas celulares con TAM y E2**

Con el objetivo de remover esteroides endógenos presentes en el suero y eliminar la débil actividad agonista del estrógeno presente en el rojo fenol, todos los cultivos celulares fueron lavados con buffer fosfato salino (PBS) y se cambió el medio DMEM libre de rojo fenol, (enriquecido con suero fetal bovino al 10% tratado con carbón vegetal) 48 horas antes de iniciar con los tratamientos.

Pasadas las 48 horas se adicionó a los cultivos celulares E2 y TAM por 24h, 48h y 96h. E2 y TAM fueron diluidos en etanol absoluto y adicionados al medio a una concentración final de 0.01µM (150) y 1µM respectivamente (151). Al final de cada periodo de tratamiento, el medio de cultivo se reemplazó con medio fresco. Como controles se hizo en paralelo cultivo de células en ausencia de E2 y TAM en los mismos tiempos y condiciones.

## **10.4. q-PCR**

**Obtención del ARN:** Se usó el kit RNAeasy (QIAGEN) para obtener el ARN. Se siguieron las indicaciones para el uso del kit con modificaciones menores. Para la obtención del ARN, se adiciono 450µL de buffer con β-mercaptoetanol con el propósito de lisar las células. Luego se adicionó 450µl de etanol, se recolectó el lisado en un tubo pasándolo por la columna (QIAGEN) para centrifugar el contenido a 10.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se cambió de tubo colector y se lavó la columna con wash buffer RW1. A la columna, la cual retiene el ARN, se le agregó 80µL de DNasa con posterior incubación de 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavó la columna varias veces con el objetivo de remover la DNasa y se dejó secar 1 hora, antes de resuspender el ARN con 100 µL de agua DEPC. Se alíquotó y almacenó a -80°C.

**Síntesis del ADNc:** se usó el Kit THERMO SCIENTIFIC® Maxima First Strand – cDNA Synthesis kit para RT-qPCR. En un volumen de 20uL uL se preparó la mezcla de reacción que contenía 2ug de ARN, dNTPs, oligo (dT), ramdon primers,

retrotranscriptasa, inhibidor de RNAsas y agua DEPC. Se siguió programa descrito por el fabricante y una vez obtenido el DNAc se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de realizar la cuantificación mediante qPCR.

**qPCR:** Los primers fueron diseñados en el programa *primerBLAST* de acuerdo con las recomendaciones reportadas por Jian Ye *et al.* 2012(152). ). Para eliminar variabilidad y asegurar reproducibilidad, se realizaron dos ensayos de cada experimento para cada gen y la qPCR se hizo por triplicado para cada ensayo. Mediante el uso del kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen cat. 11733-046) se determinó la expresión de los genes Mamoglobina, Lipofilina B y como housekeeping se utilizaron Actina beta (ACTB) y TBP (TATA box binding protein). La diferencia en los niveles de expresión de los genes en estudio se evaluó mediante análisis de expresión relativa.

### **10.5. Tipo de estudio**

Se trata de un estudio de tipo observacional, con líneas celulares como modelo *in vitro*.

### **10.6. Variables**

Las variables estudiadas corresponden a características biológicas de las líneas celulares y la respuesta que estas generaron durante el tratamiento con TAM 1.0  $\mu\text{M}$  y 0.01  $\mu\text{M}$  de E2 en periodos de tiempo de incubación de 24h, 48h y 96h.

La respuesta se evaluó midiendo la activación o supresión del gen Mamoglobina y Lipofilina B mediante, la obtención de ellos a partir de extractos celulares y posterior síntesis de ADNc, con el cual se realizó las pruebas de q-PCR. Como genes normalizadores se usaron Actina beta y TBP.

### **10.7. Tratamiento estadístico de los resultados**

Para establecer si existían diferencias significativas entre los niveles de expresión de los genes Mamoglobina, Lipofilina B y los genes *housekeeping*, en las líneas celulares estudiadas, (control y tratamientos), se aplicó la prueba de significancia por aleatorización *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*®, estableciendo significativo un valor de  $p = <0,05$ . Esta prueba se basa en el algoritmo Taylor usando el software REST® (Relative Expression Software Tool) desarrollado por Pfaffl *et al* (153).

## 11. RESULTADOS

### 11.1. Selección de los *housekeeping* o genes normalizadores

La elección de los genes normalizadores o *housekeeping* utilizados en éste estudio, fue hecha considerando resultados anteriores del grupo que indican que el GAPDH varía su expresión en controles y tratamientos con E2 y TAM. En consecuencia, se utilizaron las proteínas de unión a caja TATA (TBP) y  $\beta$ -actina.

### 11.2. Estandarización de la amplificación de fragmentos de los genes hMAM y Lipofilina B

#### 11.2.1 Diseño de los Primers

Los juegos de primers usados para la amplificación de los genes hMAM y Lipofilina B, incluyeron primers usados en estudios llevados a cabo por otros investigadores y primers diseñados en éste estudio (Tabla 8)

**Tabla 8. Primers evaluados para determinación de niveles de expresión de mamoglobina y lipofilina B.**

Gen diana	Abreviatura	Secuencia	Tamaño	Inicio	Stop	Tm	% GC	Ref.
<b>Lipofilina B</b>	L1 F	CTGAGCTCACA GCAAAC	18	31	48	54	50	Menelaos Zafrakas <i>et al.</i> 2006
	L1 R	GAGCTGGGCA GAAC	14	135	122	49.3	64.2	
<b>Lipofilina B</b>	L2 F	GCTGTTGCAGC CAAGTTAGG	20	219	238	59.7	55.0	Laboratorio Biología celular y molecular UR
	L2 R	TCACCAGGACT TCCGCAATG	20	303	284	60.3	55.0	
<b>Mamoglobina A</b>	M1 F	TGCCACTACAA ATGCCATAGA	21	219	239	57.3	42.8	Laurence Bockstaele <i>et al.</i> 2015
	M1 R	AGCCAAAGGTC TTGCAGAAA	20	363	344	57.9	45.0	
<b>Mamoglobina A</b>	M2 F	CTCTGAGCAAT GTTGAGGTGT	21	278	298	58.2	47.6	
	M2 R	CCTGCAGTTCT GTGAGCCAA	20	377	358	60.5	55	
<b>TATA binding protein</b>	TBP F	GCCAGCTTCGG AGAGTTCTGGG ATT	25	536	560	66.57	56	Laboratorio Biología celular y molecular UR
	TBP R	CGGGCACGAA GTGCAATGGTC TTTA	25	640	616	65.94	52	

### **11.2.2. Evaluación de primers en líneas celulares de Cáncer de Mama**

Los primers seleccionados fueron evaluados en un panel de 12 líneas celulares de cáncer de mama, con diversidad de patrones de expresión de receptores hormonales (RE, RP) y HER2 (entre otras características moleculares propias del tipo de cáncer que representan cada una de ellas) (Tabla 9). El programa y condiciones fueron los mismos utilizados para los ensayos de qPCR; los productos amplificados, fueron corridos en geles de agarosa al 2%. Los datos mostraron que *los primers* M1 (154) y L2 (Tabla 8), fueron los únicos que amplificaron un único fragmento, sin inespecificidades y mejores valores de Ct, por ésta razón, fueron escogidos para ser utilizados en éste estudio.

### **11.2.3. Secuenciación de los fragmentos de *hMAM* obtenidos**

Los fragmentos de *hMAM* amplificados fueron aislados y secuenciados, usando la técnica de electroforesis capilar en un secuenciador ABI 310 de Applied Biosystem, con el fin de establecer si correspondían a *hMAM*. Los amplicones fueron nuevamente amplificados mediante el reactivo *big dye terminator* (Applied Biosystem), obteniendo una homología >90% con los ARNm del gen de *hMAM*. La secuenciación se realizó en el Laboratorio de genética animal de CORPOICA.

Tabla 9. Panel de células seleccionadas para evaluar los patrones de expresión de los amplicones mamoglobina y lipofilina B.

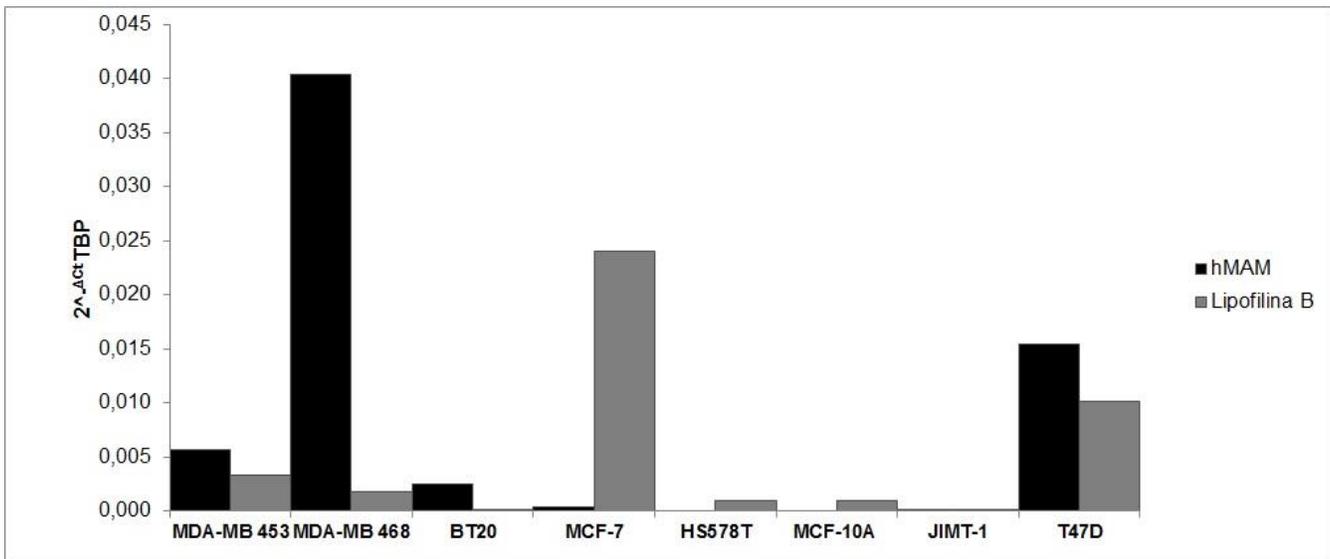
LÍNEA	SUBTIPO TUMORAL	RE	RP	HER2	P53	ORIGEN	TIPO TUMORAL	EDAD PACIENTE ORIGEN	ETNIA	MEDIO DE CULTIVO
MCF-10A	Basal tipo B	-	-	-	+/- WT	TP	F	36	B	DMEM
MCF7	Luminal A	+	+	-	+/- WT	EP	CDI	69	B	DMEM/RPMI
T47D	Luminal A	+	+	-	++	EP	CDI	54		RPMI
ZR-75-1	Luminal A	+	-	-	-	LA	CDI	63	B	RPMI
BT474	Luminal B	+	+	+	+	TP	CDI	60	B	RPMI
SKBR3	HER2+	-	-	+	+	EP	AC	43	B	DMEM
JIMT-1	HER2 +	-	-	+		EP	CDI	62	B	DMEM
KPL4	HER2+	-	-	+		EP				
BT-20	Basal tipo A	-	-	-	+/- WT	TP	CDI	74	B	DMEM
MDA-MB 453	Basal	-	-	-	-	EP	AC	48	B	DMEM
MDA-MB 468	Basal tipo A	-	-	-	+	EP	AC	51	A	DMEM
HS 578T	Basal tipo B	-	-	-	+M	TP	CDI	74	B	DMEM

RE, Receptor de estrógenos; RP, Receptor de progesterona; HER-2, Receptor de factor de crecimiento epidérmico; F, Fibroadenoma; EP, Efusión pleural; TP, Tumor primario; LA, Líquido Ascítico; CDI, Carcinoma ductal infiltrante; AC, Adenocarcinoma; B, Blanca; A, Afrodescendiente.

### 11.3. Evaluación de la expresión basal de *hMAM* y Lipofilina B en líneas celulares de cáncer de mama sin tratamientos.

Antes de evaluar el efecto de los tratamientos, en las 12 líneas celulares de cáncer de mama incluidas en éste estudio se determinó la expresión basal de *hMAM* y Lipofilina B, en condiciones normales de cultivo (medio con rojo fenol y suero fetal bovino normal) a partir de la misma cantidad de ARN, 2000ng/uL para cada síntesis de ADNc y posterior qPCR. Para la obtención de los valores de expresión génica, se utilizó el método de  $2^{-\Delta Ct}$  y como gen normalizador a TBP. Los resultados, mostraron que hay líneas celulares con baja expresión (Figura 6) y líneas con alta expresión (Figura 7), de los genes *hMAM* y Lipofilina B.

Para poder observar pequeñas variaciones de expresión de los genes estudio en el panel de líneas celulares, se dividieron en dos gráficas para no minimizar algunas expresiones en cuestión a la escala.



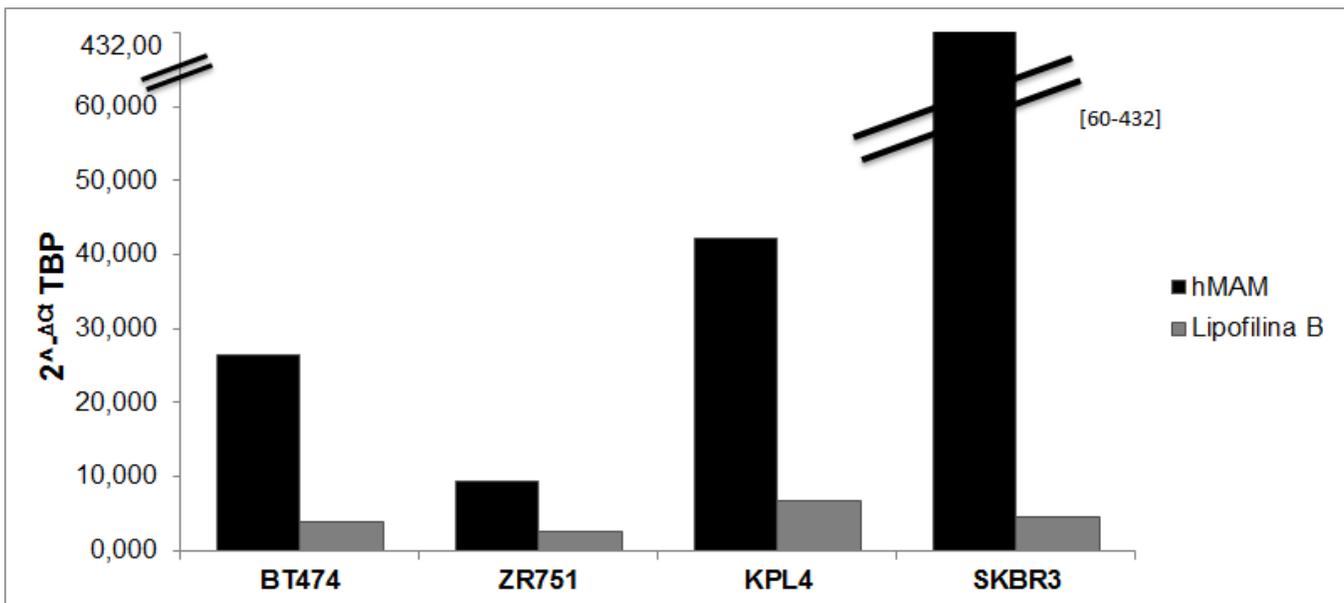
**Figura 6. Expresión relativa de *hMAM* y Lipofilina B en líneas celulares de cáncer de mama con baja expresión de los genes de estudio.**

En la anterior gráfica, a pesar de que la expresión es baja es importante resaltar que las líneas celulares con características triple negativo como BT20 y HS578T es muy baja o es indetectable la expresión de los genes *hMAM* y lipofilina B.

En MCF-7 líneas de amplio uso para estudios de cáncer de mama, no es detectable la expresión de *hMAM*, por lo contrario si se encontró expresión de lipofilina B. T47D una línea celular de cáncer de mama con características

similares en cuanto a receptores de estrógeno y progesterona que MCF-7, si presento expresión de mamoglobina y lipofilina con una relación similar. Tuvimos como criterio de selección para estudio de tratamientos, la expresión similar de ambos genes estudio en la línea celular, T47D por tener esta característica y MCF-7 por ser estándar en los estudios *in vitro* de cáncer de mama.

En esta grafica también podemos confirmar que mamoglobina no se expresa en tejido normal ya que en la línea benigna MCF-10<sup>a</sup> no hubo expresión del gen *hMAM*.



**Figura 7. Expresión relativa de *hMAM* y Lipofilina en líneas celulares de cáncer de mama con alta expresión de los genes en estudio.**

Para el panel de células con expresión relativa alta de los genes estudio (Figura 7), se puede analizar que SKBR3 y KPL4 (RE+/PR-/HER2+) tuvieron alta expresión de *hMAM* pero no proporcional a lipofilina B. En cuanto a la expresión en BT474 y ZR751 de los genes estudio, no fue tan marcada como en las anteriores dos líneas si existe una relación de expresión más pareja lo cual nos llevó a seleccionarlas para ser tenidas en cuenta para los tratamientos con TAM y E2.

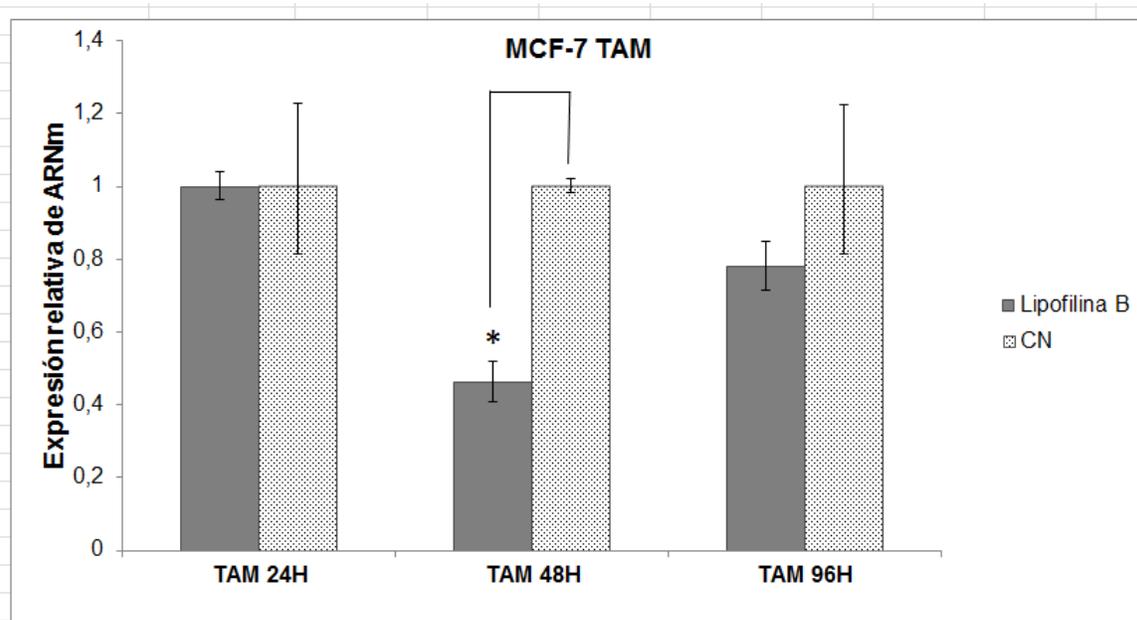
#### 11.4. Impacto del TAM en la expresión de *hMAM* y Lipofilina B

Una vez confirmada la secuencia de los amplicones de *hMAM* y Lipofilina B, se seleccionaron 5 líneas celulares (MCF-7, T47D, ZR-75-1, BT474 y JIMT-1) de las 12 inicialmente evaluadas, para ser tratadas con E2 y TAM. De éstas, las tres

primeras expresan diferencialmente el receptor hormonal RE (MCF-7, T47D, y ZR-75-1), una co-expresa RE y HER2 (BT474); mientras que la última (JIMT-1) solo expresa HER2 y no expresa *hMAM*, razón por la que se incluyó como control negativo de la expresión de éste gen. Las líneas mencionadas representan 3 de los 5 subtipos tumorales de cáncer de mama. Teniendo en cuenta que uno de los objetivos del presente trabajo fue el de establecer una posible correlación entre RE, RP y HER2 con la expresión de los genes en estudio, las líneas celulares de origen triple negativo no se incluyeron en el estudio por su expresión no detectable de *hMAM* y Lipofilina B. Es importante mencionar que otro factor decisivo para la selección de las líneas celulares fue disponibilidad de tiempo, material biológico y reactivos.

### MCF-7

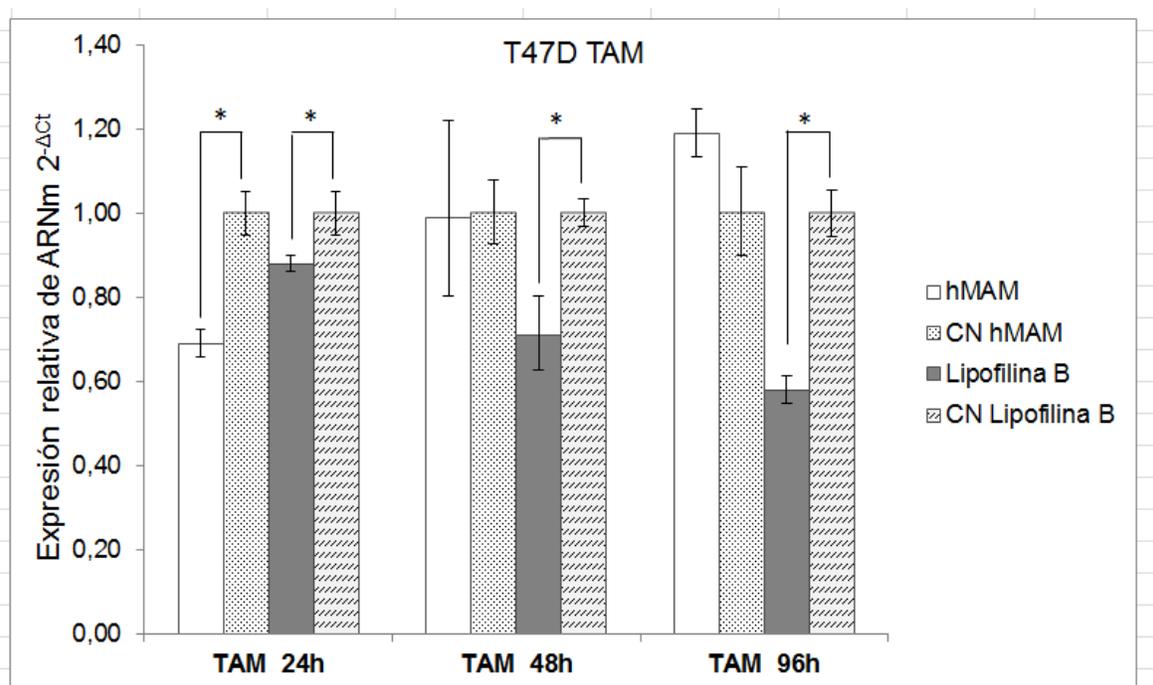
En esta línea celular se observó que la adición de TAM durante 48h conduce a una reducción significativa ( $p= 0,025$ ) de la expresión de Lipofilina B, con un factor de expresión de 0,461. Aunque la disminución de la expresión de lipofilina también fue observada después de 96h de tratamiento, esta reducción no fue estadísticamente significativa (Figura 8). Los datos de expresión del gen de la Lipofilina B correspondientes al tratamiento de MCF-7 con TAM, permiten inferir que este modulador selectivo del receptor de estrógenos disminuye la expresión del gen estudiado a las 48h. Aunque la misma tendencia es observada a las 96 h, la falta de significancia impide concluir que el efecto se mantiene durante todo el tiempo del estudio.



**Figura 8. Expresión relativa de lipofilina B después de tratamiento con TAM (1uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular MCF-7. CTRL (Control sin tratamiento)\* $p= 0.05$**

### T47D

La adición de TAM a T47D condujo a una reducción en la expresión de Lipofilina B, supresión que incremento a mayor tiempo de exposición. Resultados contrarios fueron observados para *hMAM*: mientras que TAM causa reducción en la expresión de *hMAM* a 24h, a 96h conduce a un incremento en la expresión de la misma, sin embargo estas diferencias en expresión no mostraron ser estadísticamente significativas con el control (Figura 9).

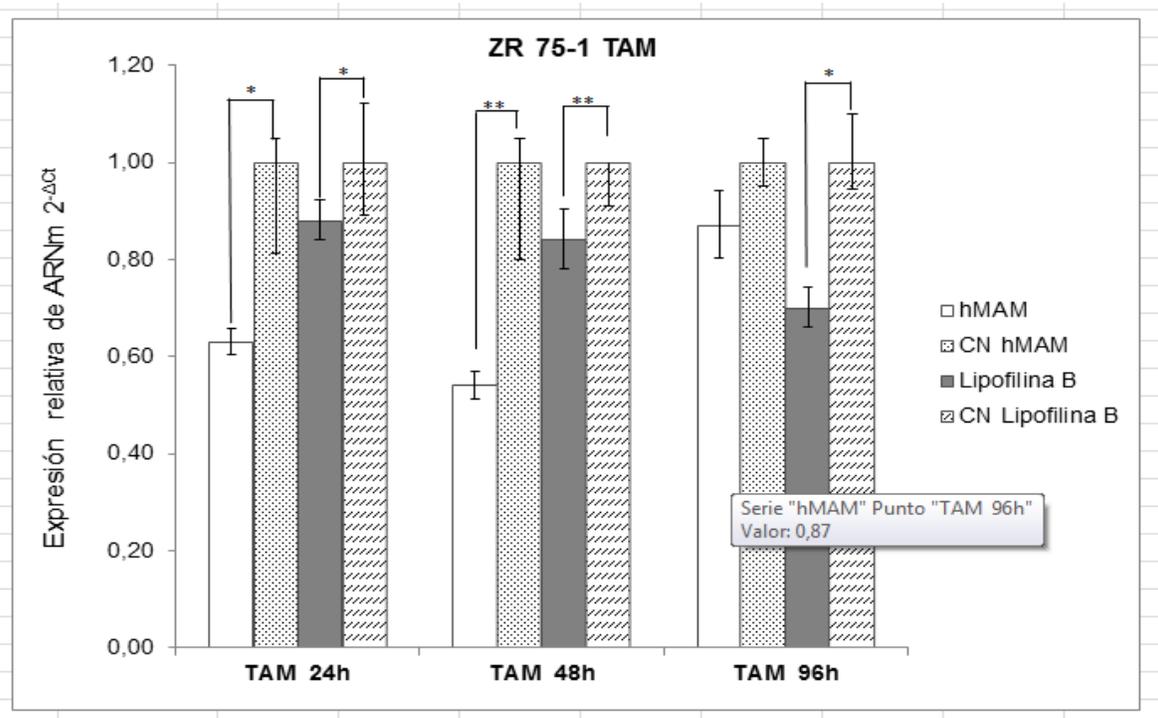


**Figura 9. Expresión relativa de *hMAM* y lipofilina B después de tratamiento con TAM (1uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular T47D. CTRL (Control sin tratamiento)\* $p= 0.05$**

### ZR 75-1

Los resultados obtenidos para ZR 75-1 muestran la tendencia ya encontrada en las anteriores líneas, en cuanto a la supresión de los genes en estudio (Figura 10). En esta línea celular, el efecto del TAM sobre la reducción en la expresión de los

genes en estudio fue mayor (y significativa estadísticamente a 48h) comparada con lo observado en MCF-7 y T47D. Semejante a T47D, la expresión de *hMAM* fue similar al control a 96h de tratamiento. Para lipofilina B la expresión fue inversamente proporcional al tiempo de tratamiento, siendo esta menor a 96h. El reducido efecto en la supresión de la expresión de *hMAM* en las líneas celulares T47D y ZR 75-1 a 96h de tratamiento, podría indicar que *hMAM* es un gen de respuesta temprana, por lo que los mayores efectos de TAM son observados principalmente a 24h y 48h.



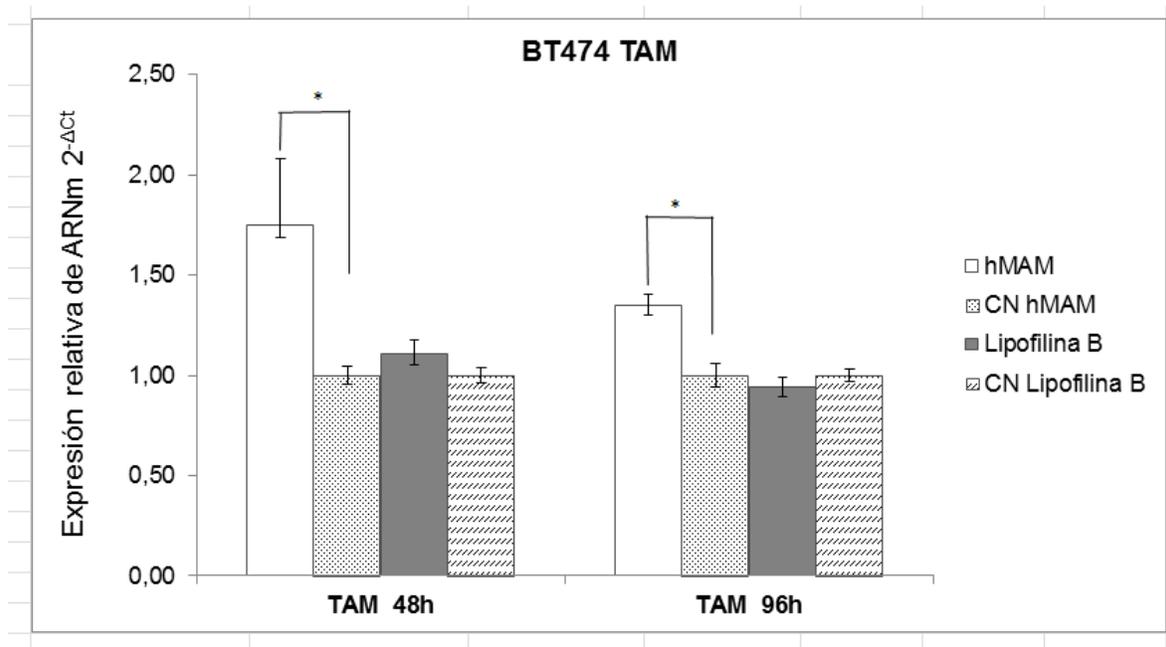
**Figura 10.** Expresión relativa de *hMAM* y lipofilina B después de tratamiento con TAM (1uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular ZR 75-1. CTRL (Control sin tratamiento) \* $p= 0.05$ , \*\* $p= 0,001$

#### BT474

Debido a problemas presentados con la muestra obtenida a las 24 h, no se presentan los valores de expresión relativa de ARNm correspondientes. Los resultados observados en BT474 (RE+/HER2+) después de tratamiento con TAM por 48h y 96h, fueron opuestos a lo observado en las anteriores líneas celulares (todas RE+/HER2-). En esta línea celular, la adición de TAM induce aumento en la expresión de *hMAM* (con un factor de hasta 1,74 de incremento) a las 24h. Por su

parte, la expresión de lipofilina B no fue diferente en ausencia y presencia de TAM (Figura 11).

El aumento de la expresión de hMAM después del tratamiento, contrario a la tendencia observada en las anteriores líneas celulares, puede deberse a la sobreexpresión de HER2 en BT474, ya que las anteriores líneas no lo expresaban. Adicionalmente, es posible que la regulación positiva de hMAM aquí observada, esté modulada no sólo por vías de señalización mediadas por REs sino también, por receptores con actividad tirosina quinasa.



**Figura 11. Expresión relativa de *hMAM* y lipofilina B después de tratamiento con TAM (1uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular BT474. CTRL (Control sin tratamiento) \* $p= 0.05$**

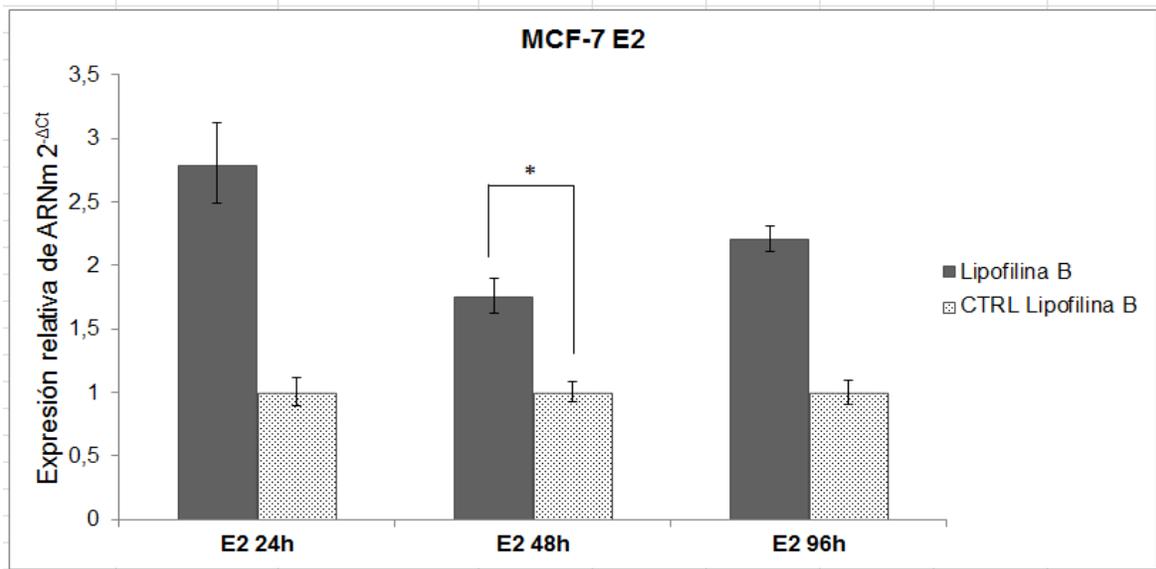
### JIMT-1

Comprobando lo mostrado en la Figura 6, JIMT-1 no expresa los genes hMAM y Lipofilina B.

### 11.5. Impacto del E2 en la expresión de *hMAM* y lipofilina B

#### MCF-7.

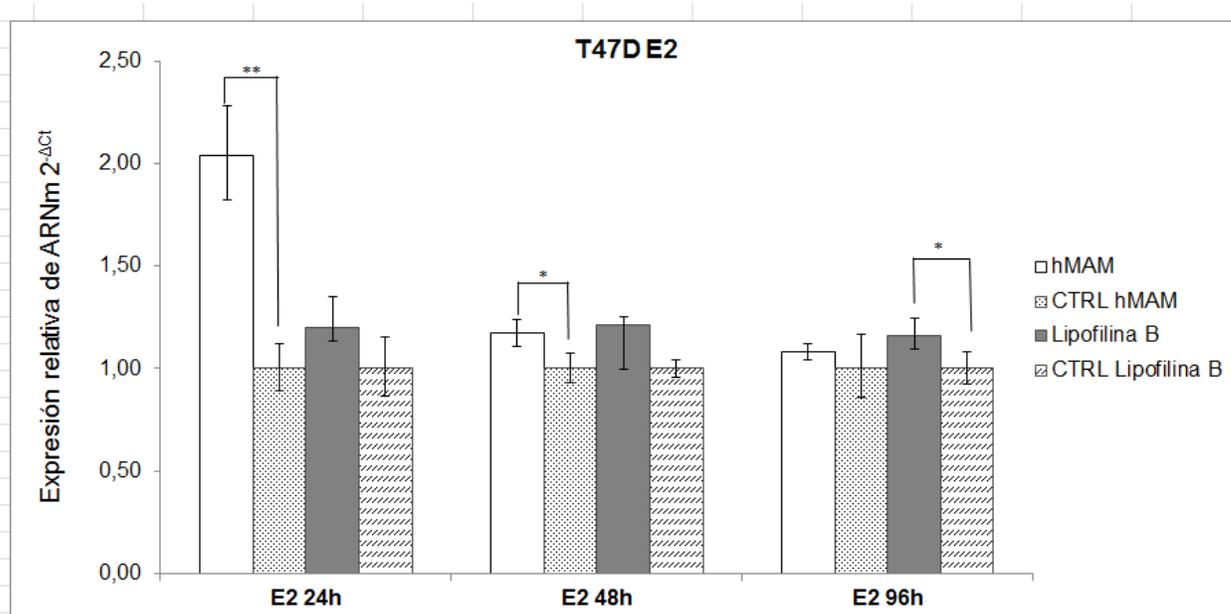
El efecto de E2 en la modulación de la expresión de Lipofilina B fue contrario al observado después del tratamiento con TAM. E2 incrementa significativamente la expresión de lipofilina con respecto al control, a las 48h. A pesar que las diferencias de expresión no fueron significativas en todos los tiempos del tratamiento, se observa una tendencia al aumento de expresión (Figura 12).



**Figura 12. Expresión relativa de lipofilina B después de tratamiento con E2 (0,01uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular MCF-7. CTRL (Control sin tratamiento) \* $p= 0.05$**

#### T47D

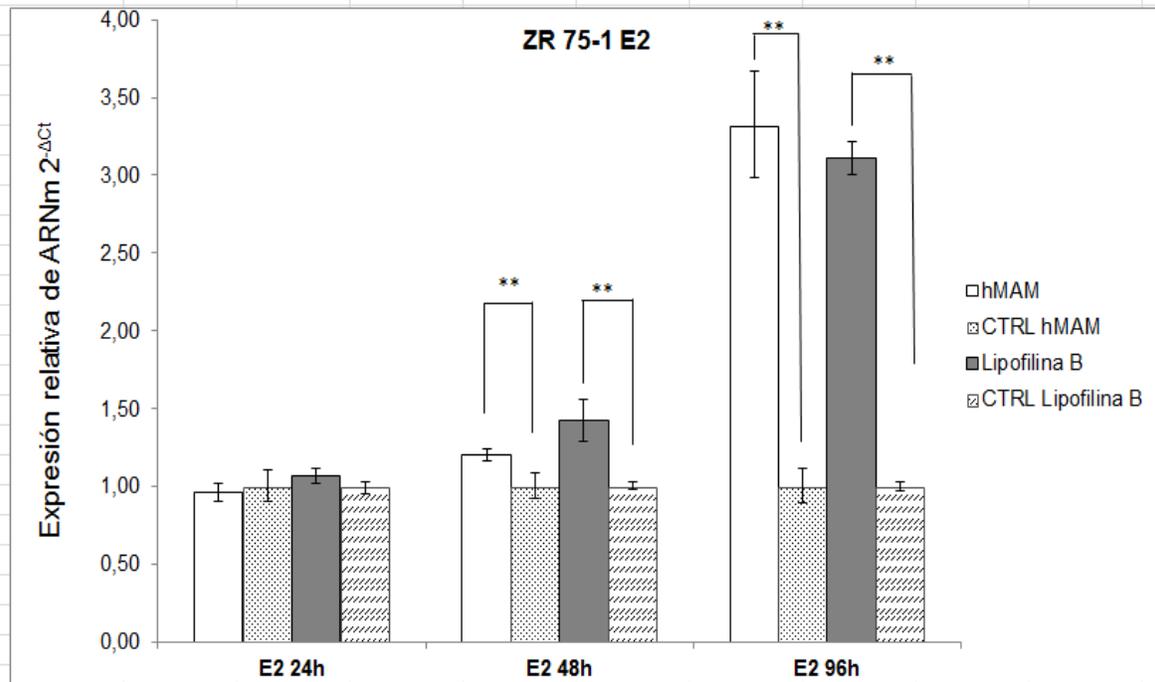
El tratamiento de ésta línea celular E2, resulta en el incremento en la expresión de *hMAM* a las 24h. No afecta la expresión de Lipofilina B en ninguno de los tiempos evaluados. Estos resultados pueden sugerir que *hMAM* es un gen de respuesta temprana, dada no sólo la modulación temprana de su expresión después de la adición de E2 sino también después del tratamiento con TAM (Figura 13).



**Figura 13. Expresión relativa de *hMAM* y lipofilina B después de tratamiento con E2 (0,01uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular T47D. CTRL (Control sin tratamiento) \* $p= 0.05$ , \*\* $p= 0.001$**

### ZR75-1

En la línea celular ZR75-1, la respuesta al tratamiento con E2 fue inversa a la observada en T47D. Mientras que *hMAM* y Lipofilina B no mostraron variaciones en su expresión a 24h de tratamiento con respecto al control, a las 48h y 96h su expresión aumentó significativamente, siendo mayor a las 96h (Figura 14).

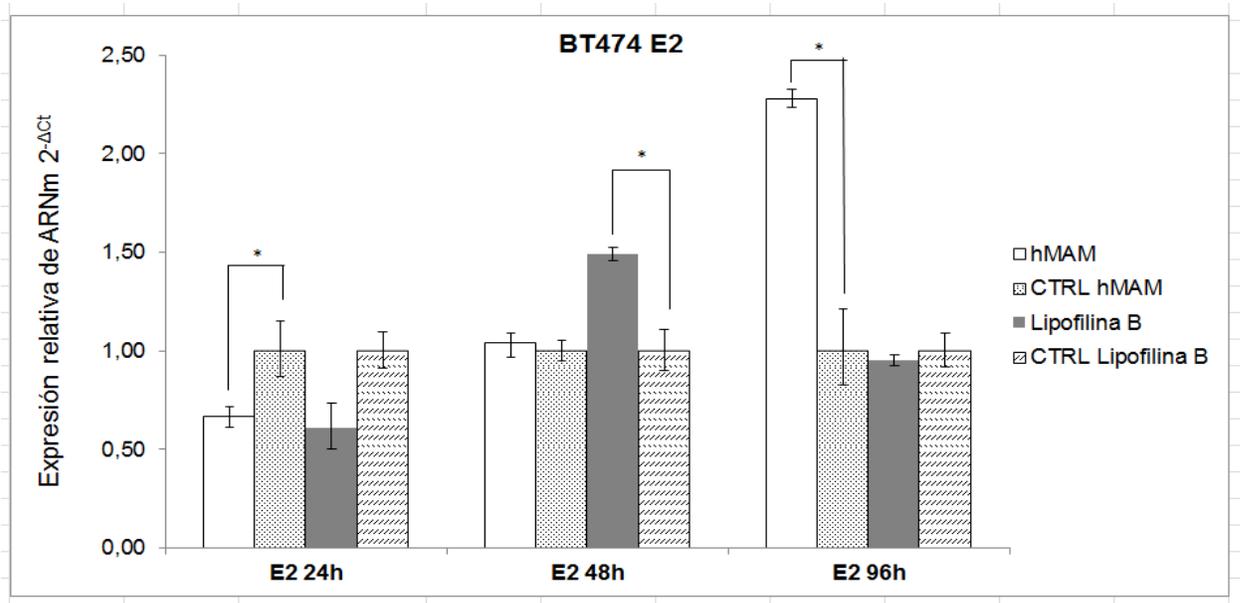


**Figura 14. Expresión relativa de *hMAM* y lipofilina B después de tratamiento con E2 (0,01uM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular ZR 75-1. CTRL (Control sin tratamiento) \* $p= 0.05$ , \*\* $p= 0.001$**

Los resultados obtenidos en las líneas celulares MCF-7, T47D y ZR-75-1 después de tratamiento con TAM y E2, permiten confirmar el papel de TAM como antagonista a estrógenos en líneas celulares positiva para RE y negativa para HER2.

#### **BT474.**

En la línea celular BT474 la expresión de *hMAM* y Lipofilina B en 24h de tratamiento, disminuye contrario a lo encontrado en las anteriores líneas celulares; sin embargo a las 48h, *hMAM* al aumentar el tiempo de exposición a E2 la expresión se normaliza con respecto al control, por su parte lipofilina B aumenta su expresión. Para 96h de exposición en el tratamiento con E2, lipofilina redujo su expresión hasta ser igual a su control, contrario a lo ocurrido por *hMAM* que aumento a más del doble de expresión respecto al control (Figura 15), concordando en este tiempo de tratamiento con lo ocurrido en la expresión de este gen en la línea ZR 75-1, pero no con lipofilina B, sugiriendo que para esta línea celular que difiere con las anteriores en su perfil de expresión por la presencia de HER2, las proteínas MAM y lipofilina B no se encuentran formando el complejo descrito, basamos nuestra afirmación en la diferencia de expresión,



**Figura 15. Expresión relativa de hMAM y lipofilina B después de tratamiento con E2 (0,01μM) por 24h, 48h y 96h en la línea celular BT474. CTRL (Control sin tratamiento)\*p= 0.05**

### JIMT-1.

**En esta línea celular no se encontró expresión de los genes en estudio como se mostró con anterioridad.**

## 12. DISCUSIÓN

Las Secretoglobinas, incluyendo hMAM y Lipofilina B son pequeñas proteínas secretadas, cada vez más reconocidos por su utilidad pronóstica en varios tipos de cánceres humanos. A pesar de lo anterior, sus funciones fisiopatológicas precisas son pobremente conocidas. La expresión de secretoglobinas se ha observado generalmente en epitelios secretores(37, 40, 55, 159) y su expresión desregulada ha sido indicada en enfermedades malignas como cáncer de pulmón(159), cáncer de mama(50) y cánceres ginecológicos(160). De allí la importancia de la evaluación de la modificación de su expresión en respuesta a E2 y TAM en células de cáncer de seno.

En el panel de 12 líneas celulares analizadas, en diez de estas se observó expresión tanto de hMAM como de Lipofilina B, sin embargo los niveles de expresión de hMAM fueron significativamente más altos que los observados en Lipofilina B. A pesar de que expresión de hMAM fue totalmente ausente en MCF7 y JIMT-1, nuestros resultados nos permiten confirmar que la expresión de hMAM y Lipofilina B están co-expresadas en las líneas celulares analizadas pero no en las mismas proporciones, lo que pondría en entre dicho la hipótesis de que las proteínas se encuentran formando un complejo en la glándula mamaria, necesitando realizar estudios a nivel traduccional como por ejemplo western blot o inmunoprecipitación de proteínas.

Los hallazgos de expresión en el panel de líneas celulares de cáncer de mama de este estudio concuerdan parcialmente con los hallazgos reportados por Zafrakas *et al.* 2006 quienes encontraron que ZR-75-1 (RE+/RP+/HER2-) expresa fuertemente mamoglobina mientras que su expresión en MCF-7 (RE+/RP+/HER2-) (155) y MCF-10A (RE-/RP-/HER2-) es indetectable (156). A diferencia del estudio anterior, en este trabajo se encontró una baja expresión de mamoglobina y lipofilina B en las líneas celulares MDA-MB468 (RE-/RP-/HER2-) y T47D (RE+/RP+/HER2-). Mientras que en la línea celular SKBR3 (RE-/RP-/HER2+) fue observada una fuerte expresión de mamoglobina y lipofilina B, semejante a lo reportado por Brown *et al.* 2006 (157).

En cuanto a Lipofilina B, se observó expresión de la misma en las líneas celulares ZR751, BT474, SKBR3 y KPL4, contrario a lo reportado por Culleton *et al.* 2007, quienes no encontraron expresión detectable en estas líneas celulares, pudiendo deberse a la robustez de las técnicas utilizadas (158). Aunque la mayor expresión de hMAM y Lipofilina B fue observada en líneas positivas para HER2 (BT474 y SKBR3), nuestros datos indican que la expresión de hMAM no depende de la presencia de RE, ya que hMAM y Lipofilina B fueron co-expresadas por líneas RE

positivas (ZR-75-1, BT474) y RE negativas (SKBR3 y KPL4). Es interesante resaltar que la línea celular ZR-75-1 (RE+/HER2-), mostró alta expresión de los genes en estudio, contrario a lo observado en MCF-7 y T47D, también RE+/HER2-. Esta expresión diferencial de hMAM y lipofilina B podría ser asociada con el estado de los RPs, los que están ausentes en las líneas que mostraron expresión de los mismos.

De acuerdo con los anteriores resultados se puede concluir que, aparentemente la expresión de hMAM y Lipofilina es independiente de los REs, dependiente de los RPs y mayor en células que sobre-expresan HER2 (Tabla 10). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Zuo *et al.*, 2009 quienes mediante estudios de western blot comprobaron la presencia de mamoglobina en citoplasma y membrana celular en líneas celulares que conservan los patrones de expresión ya sea RE+ RP+ o HER2 enriquecido (48).

**Tabla 10. Patrones de expresión de Receptores hormonales, HER2, hMAM y Lipofilina B en líneas celulares de cáncer de mama (sin tratamiento)**

Línea Celular	RE	RP	HER2	hMAM	Lipofilina B
MCF-10A	-	-	-	-	-
MCF7	+	+	-	-	+
T47D	+	+	-	+	+
ZR-75-1	+	-	-	++	++
BT474	+	+	+	+++	++
SKBR3	-	-	+	+++	++
JIMT-1	-	+	+	-	-
KPL4	-	-	+	+++	+++
BT-20	-	-	-	-	-
MDA-MB 453	-	-	-	-	-
MDA-MB 468	-	-	-	+	-
HS 578T	-	-	-	-	-
<b>+++ Alta expresión</b>					
<b>++ Mediana expresión</b>					
<b>+ Baja expresión</b>					

El estudio reportado por Picot et al.2015 (161), mediante silenciamiento del gen *hMAM* en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB 231, que se caracteriza por una fuerte agresividad, el crecimiento celular disminuyó, asociándolo a la supresión de *hMAM*. Tomando el hallazgo del anterior estudio, nuestros resultados pueden inferir que la alta expresión de *hMAM* puede jugar un papel importante en el fenotipo agresivo y poco favorable de algunas líneas celulares como ZR 75-1, BT 474, SKBR3 y KPL4. Sin embargo nuestro grupo debe realizar más estudio a nivel *in vitro* e *in vivo* para corroborar estos supuestos.

Posterior a la adición de E2 se observó que los niveles de expresión de *hMAM* y Lipofilina B incrementaron en todas las líneas celulares analizadas, independientemente del estado de receptores hormonales (RE, RP) y de receptores de factores de crecimiento (HER2), sin embargo el mayor efecto fue observado en células expresando HER2 (Tabla 11). Estos resultados indican que estos genes están posiblemente implicados en el transporte y funcionalidad de hormonas esteroideas como ha sido previamente reportado(51).

Interesantemente los efectos observados en la expresión de *hMAM* y Lipofilina B después de adición de TAM son contrarios a estos observados con E2. En las líneas celulares analizadas TAM modifica la expresión de *hMAM* y lipofilina B diferencialmente de acuerdo con la presencia de REs y HER2: mientras que en la línea celular BT474 (ER+/HER2+), TAM condujo a una incrementada expresión de *hMAM* y Lipofilina B, en ZR-75-1 (ER+/HER2-), se observó una reducción en la expresión de los dos genes (Tabla 11). Estos resultados indican no solo que TAM podría estar actuando como un agonista a estrógenos en células que co-expresan los dos receptores sino que *hMAM* podría ser considerado como marcador de resistencia a TAM en este tipo celular. De hecho, cross-talking entre las vías de señalización mediadas por REs y por Receptores de factores de crecimiento (EGFR, IGF-1, HER2) han sido implicadas en proliferación celular, supervivencia y resistencia a terapia endocrina (TAM) en cáncer de mama(162, 163). También Picot et al. 2015 describe que la supresión de la expresión de *hMAM* disminuye los eventos de fosforilación de algunas proteínas con actividad quinasa (p38, ERK1/2 y JNK) (161), nosotros proponemos que la sobreexpresión de *hMAM* además de ser un posible marcador de resistencia endocrina también puede ser un factor importante que favorezca esta resistencia teniendo una posible intervención en vías de proteínas con actividad tirosina quinasa.

Adicionalmente, la variabilidad en la expresión diferencial de *hMAM* observada entre líneas celulares RE+/HER2- en respuesta a tratamiento con TAM, sugiere que se debe tener especial atención al evaluar la respuesta a tratamiento

hormonal a pesar de que los tipos celulares estudiados se encuentren similarmente clasificados.

Teniendo en cuenta que hMAM y Lipofilina B se heterodimerizan para formar tetrámeros (55) se esperaría que la modificación de sus niveles de expresión por E2 y/o TAM fuera semejante. Sin embargo tal efecto no fue observado en T47D, donde después de adición de TAM, incremento los niveles de expresión de hMAM y disminución en los de Lipofilina B. Estos resultados podrían indicar que en este tipo celular (RE+/RP+/HER2-) las interacciones entre estas proteínas no son obligatoriamente necesarias y que Lipofilina B podría existir de forma libre, razón por la que podría ser considerada como un marcador independiente de respuesta a tratamiento, como ha sido recientemente sugerido para pacientes con cáncer de ovario (54).

En general en todas las líneas celulares RE+/HER2- se observó una disminución en la expresión de Lipofilina B después de adición de TAM, siendo necesario realizar más investigaciones de estos genes para que sean postulados como posibles marcadores de pronóstico y respuesta a terapia hormonal. De hecho, bajos niveles de expresión de Lipofilina B han sido asociados con mayor supervivencia libre de enfermedad en cáncer de ovario (54). Sin embargo son necesarios estudios *in vivo* que permitan confirmar los resultados aquí observados y permitan elucidar su función biológica y su papel en carcinogénesis de mama.

**Tabla 11. Expresión genes en estudio en líneas celulares de cáncer de mama después de tratamiento con E2 y TAM.**

Línea Celular	hMAM						LIPB		
	RE	RP	HER2	CTRL	E2	TAM	CTRL	E2	TAM
<b>MCF7</b>	+	+	-	-	-	-	+	++	+/-
<b>T47D</b>	+	+	-	+	++	+/-	+	++	+/-
<b>ZR-75-1</b>	+	-	-	++	+++	+/-	++	+++	+/-
<b>BT474</b>	+	+	+	+++	++++	++++	++	+++	++
<b>JIMT-1</b>	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>+++</b>	Alta						expresión expresión expresión		
<b>++</b>	Mediana								
<b>+</b>	Baja								
<b>+/-</b>	Expresión reducida comparada con el control								

### 13. CONCLUSIONES

- ✓ Líneas celulares de cáncer de seno con estatus triple negativo presentan una baja expresión de mamoglobina y lipofilina B.
- ✓ La expresión de los genes hMAM y lipofilina B fue modificada por el E2 y TAM, confirmando que estos genes son regulados por la vía de señalización de estrógenos.
- ✓ TAM y E2 modifican diferencialmente la expresión de hMAM y lipofilina B de acuerdo con la presencia y/o ausencia de REs y HER2.
- ✓ Líneas celulares RE+/HER2- tienen una tendencia a la reducción de hMAM y de lipofilina B cuando son tratadas con TAM, mientras que el tratamiento con E2 induce un incremento en la expresión de las mismas. Estos resultados permiten confirmar el papel de TAM como un antagonista de estrógenos en estas líneas celulares.
- ✓ En líneas celulares RE+/HER2-, hMAM muestra un patrón de respuesta temprana, dado que su expresión se ve modificada principalmente a 24h y 48h.
- ✓ A diferencia de las líneas celulares antes mencionadas (RE+/HER2-) asociadas a mejor pronóstico, BT474 (HER2+) es asociada a un peor pronóstico. Esta línea celular contrario a lo observado en líneas celulares RE+/HER2-, incremento en la expresión de mamoglobina luego de su tratamiento con TAM, similar a lo observado después de tratamiento con E2. Estos resultados indican que TAM actúa como un agonista a estrógenos en líneas celulares HER2+, donde la expresión de hMAM podría estar siendo modulada no sólo por vías de señalización mediadas por REs sino por vías de señalización mediadas por receptores con actividad tirosina quinasa.
- ✓ El tratamiento con E2 en las líneas celulares ER+/HER2- presenta de manera general un comportamiento opuesto a lo observado cuando las células son tratadas con TAM, mamoglobina y/o Lipofilina B aumentan su expresión después del tratamiento.
- ✓ Con base en los resultados se podría decir que el TAM y el E2 parecen tener un efecto modulador de los genes estudiados, particularmente E2 parece aumentar los niveles de expresión de uno u otro gen lo que estaría en concordancia con lo reportado en otros estudios donde se postula un incremento de estas secretoglobinas con un mejor pronóstico dada su asociación con cánceres ER+.
- ✓ Los resultados de modulación de expresión de los genes estudio en algunas líneas celulares de cáncer de seno, donde se encontró que no se modulan en el mismo sentido, podría indicar que las secretoglobinas

estudiadas no siempre se encuentran formando un complejo, si no que podrían estar de manera individual desarrollando sus funciones.

## 14. REFERENCIAS

1. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3):412-24.
2. González-Mariño MA. Evaluating the usefulness of a breast screening program in Bogotá, Colombia. *Rev salud pública*. 2012;14(1):41-52.
3. Murillo Moreno R, Piñeros Petersen M. Anuario estadístico 2010. Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Cancerología; 2012. Report No.: Contract No.
4. Lumachi F, Santeufemia DA, Basso SM. Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World J Biol Chem*. 2015;6(3):231-9.
5. Vincenzo R, Bruno M, Cesare C, Chiara D, Lucia Z, Daniele S. Estrogens and male reproduction. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
6. Lebrun CE, van der Schouw YT, de Jong FH, Pols HA, Grobbee DE, Lamberts SW. Endogenous oestrogens are related to cognition in healthy elderly women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;63(1):50-5.
7. IARC Monographs [Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol72/index.php> Acceso: 19 noviembre de 2015.
8. Seeger H, Mueck AO. Are the progestins responsible for breast cancer risk during hormone therapy in the postmenopause? Experimental vs. clinical data. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;109(1-2):11-5.
9. Yue W, Santen RJ, Wang JP, Li Y, Verderame MF, Bocchinfuso WP, et al. Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;86(3-5):477-86.
10. Brown SB, Hankinson SE. Endogenous estrogens and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancers. *Steroids*. 2015;99(Pt A):8-10.
11. Liehr JG. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev*. 2000;21(1):40-54.
12. Russo J, Fernandez SV, Russo PA, Fernbaugh R, Sheriff FS, Lareef HM, et al. 17-Beta-estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. *Faseb j*. 2006;20(10):1622-34.
13. Santen RJ. To block estrogen's synthesis or action: that is the question. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(7):3007-12.
14. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(7):966-78.
15. Raju KSR, Taneja I, Valicherla GR, Challagundla MK, Rashid M, Syed AA, et al. No effect on pharmacokinetics of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen by multiple doses of red clover capsule in rats. *Sci Rep*. 2015;5:16126.
16. Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(9):631-43.

17. Videira M, Reis RL, Brito MA. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1846(2):312-25.
18. Kenicer J, Spears M, Lyttle N, Taylor KJ, Liao L, Cunningham CA, et al. Molecular characterisation of isogenic taxane resistant cell lines identify novel drivers of drug resistance. *BMC Cancer*. 2014;14(1):762.
19. Li G, Zhang J, Jin K, He K, Wang H, Lu H, et al. Human mammaglobin: A superior marker for reverse-transcriptase PCR in detecting circulating tumor cells in breast cancer patients. *Biomarkers in Medicine*. 2011;5(2):249-60.
20. Hard T, Barnes HJ, Larsson C, Gustafsson JA, Lund J. Solution structure of a mammalian PCB-binding protein in complex with a PCB. *Nat Struct Biol*. 1995;2(11):983-9.
21. Maccioni M, Riera CM, Rivero VE. Identification of rat prostatic steroid binding protein (PSBP) as an immunosuppressive factor. *J Reprod Immunol*. 2001;50(2):133-49.
22. Carter D, Douglass JF, Cornellison CD, Retter MW, Johnson JC, Bennington AA, et al. Purification and characterization of the mammaglobin/lipophilin B complex, a promising diagnostic marker for breast cancer. *Biochemistry*. 2002;41(21):6714-22.
23. Klug J, Beier HM, Bernard A, Chilton BS, Fleming TP, Lehrer RI, et al. Uteroglobulin/clara cell 10-kDa family of proteins: Nomenclature committee report. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;923:348-54.
24. Colpitts TL, Billing-Medel P, Friedman P, Granados EN, Hayden M, Hodges S, et al. Mammaglobin is found in breast tissue as a complex with BU101. *Biochemistry*. 2001;40(37):11048-59.
25. Tewari K, Manetta A. In vitro chemosensitivity testing and mechanisms of drug resistance. *Curr Oncol Rep*. 1999;1(1):77-84.
26. Karam M, Bièche I, Legay C, Vacher S, Auclair C, Ricort J-M. Protein kinase D1 regulates ER $\alpha$ -positive breast cancer cell growth response to 17 $\beta$ -estradiol and contributes to poor prognosis in patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2014;18(12):2536-52.
27. Piñeros M, Instituto Nacional de Cancerología B, Colombia, Sánchez R, Instituto Nacional de Cancerología B, Colombia, Universidad Nacional de Colombia B, Colombia, Perry F, et al. Demoras en el diagnóstico y tratamiento de mujeres con cáncer de mama en Bogotá, Colombia. *Salud pública Méx*. 2011;53(6):478-85.
28. Lee GW, Kim JY, Koh EH, Kang D, Choi DS, Maeng KY, et al. Plasma human mammaglobin mRNA associated with poor outcome in patients with breast cancer. *Genet Mol Res*. 2012;11(4):4034-42.
29. Colleoni M, Gelber S, Goldhirsch A, Aebi S, Castiglione-Gertsch M, Price KN, et al. Tamoxifen after adjuvant chemotherapy for premenopausal women with lymph node-positive breast cancer: International Breast Cancer Study Group Trial 13-93. *J Clin Oncol*. 2006;24(9):1332-41.
30. Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;50(1):3-22.

31. Egeland NG, Lunde S, Jonsdottir K, Lende TH, Cronin-Fenton D, Gilje B, et al. The Role of MicroRNAs as Predictors of Response to Tamoxifen Treatment in Breast Cancer Patients. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):24243-75.
32. Gamboa Ó, Díaz S, Chicaíza L, García M. Análisis de costo-efectividad en Colombia de anastrozol Vs. tamoxifeno como terapia inicial en mujeres con cáncer temprano de mama y receptor hormonal positivo. *Biomédica.* 2010;30:46-55.
33. Dowsett M, Goldhirsch A, Hayes DF, Senn HJ, Wood W, Viale G. International Web-based consultation on priorities for translational breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2007. p. R81.
34. Franchet C, Duprez-Paumier R, Lacroix-Triki M. [Molecular taxonomy of luminal breast cancer in 2015]. *Bull Cancer.* 2015;102(6 Suppl 1):S34-46.
35. Kalimutho M, Parsons K, Mittal D, Lopez JA, Srihari S, Khanna KK. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer: Combating a Stubborn Disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2015.
36. Liu N, Zhang W, Shao Y. [Mammaglobin mRNA measurement in the detection of micrometastasis in peripheral blood of breast cancer patients]. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology].* 2001;23(4):317-9.
37. Watson MA, Fleming TP. Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer. *Cancer Res.* 1994;54(17):4598-602.
38. Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res.* 1996;56(4):860-5.
39. Zehentner BK, Carter D. Mammaglobin: A candidate diagnostic marker for breast cancer. *Clin Biochem.* 2004;37(4):249-57.
40. Becker RM, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Watson MA, Fleming TP. Identification of mammaglobin B, a novel member of the uteroglobin gene family. *Genomics.* 1998;54(1):70-8.
41. Watson MA, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Fleming TP. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to Chromosome 11q13. *Oncogene.* 1998;16(6):817-24.
42. Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol* 1999;17(7):2015-9.
43. O'Brien NA, O'Donovan N, Ryan B, Hill ADK, McDermott E, O'Higgins N, et al. Mammaglobin a in breast cancer: Existence of multiple molecular forms. *Int J Cancer.* 2005;114(4):623-7.
44. Bregni M, Fleischhauer K, Bernardi M, Pescarollo A, Guggiari E, Lunghi F, et al. Bone marrow mammaglobin expression as a marker of graft-versus-tumor effect after reduced-intensity allografting for advanced breast cancer. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37(3):311-5.
45. Ferro P, Franceschini MC, Bacigalupo B, Dessanti P, Falco E, Fontana V, et al. Detection of circulating tumour cells in breast cancer patients using human mammaglobin RT-PCR: association with clinical prognostic factors. *Anticancer Res.* 2010;30(6):2377-82.

46. Radwan WM, Moussa HS, Essa ES, Kandil SH, Kamel AM. Peripheral blood mammaglobin gene expression for diagnosis and prediction of metastasis in breast cancer patients. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2013;9(1):66-70.
47. Zehentner BK, Persing DH, Deme A, Toure P, Hawes SE, Brooks L, et al. Mammaglobin as a novel breast cancer biomarker: multigene reverse transcription-PCR assay and sandwich ELISA. *Clin Chem*. 2004;50(11):2069-76.
48. Zuo L, Li L, Wang Q, Fleming TP, You S. Mammaglobin as a potential molecular target for breast cancer drug delivery. *Cancer Cell Int*. 2009;9:8.
49. Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Research*. 1996;56(4):860-5.
50. Sjödin A, Ljuslinder I, Henriksson R, Hedman H. Mammaglobin and lipophilin B expression in breast tumors and their lack of effect on breast cancer cell proliferation. *Anticancer Res*. 2008;28(3 A):1493-8.
51. Pattabiraman N, Matthews JH, Ward KB, Mantile-Selvaggi G, Miele L, Mukherjee AB. Crystal structure analysis of recombinant human uteroglobin and molecular modeling of ligand binding. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;923:113-27.
52. Galvis-Jimenez JM, Curtidor H, Patarroyo MA, Monterrey P, Ramirez-Clavijo SR. Mammaglobin peptide as a novel biomarker for breast cancer detection. *Cancer Biol Ther*. 2013;14(4):327-32.
53. Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, et al. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D662-9.
54. Bignotti E, Tassi RA, Calza S, Ravaggi A, Rossi E, Donzelli C, et al. Secretoglobin expression in ovarian carcinoma: lipophilin B gene upregulation as an independent marker of better prognosis. *J Transl Med*. 2013;11:162.
55. Mukherjee AB, Kundu GC, Mantile-Selvaggi G, Yuan CJ, Mandal AK, Chattopadhyay S, et al. Uteroglobin: a novel cytokine? *Cell Mol Life Sci*. 1999;55(5):771-87.
56. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1989;7(8):1120-8.
57. Cirisano FD, Karlan BY. The Role of the HER-2/neu Oncogene in Gynecologic Cancers. *J Soc Gynecol Investig*. 1996;3(3):99-105.
58. Reese DM, Slamon DJ. HER-2/neu Signal Transduction in Human Breast and Ovarian Cancer. *Stem Cells*. 1997;15(1):1-8.
59. Sjögren S, Inganäs M, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol*. 1998;16(2):462-9.
60. Nieto Y, Cagnoni PJ, Nawaz S, Shpall EJ, Yerushalmi R, Cook B, et al. Evaluation of the predictive value of Her-2/neu overexpression and p53 mutations in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2000;18(10):2070-80.
61. Hayes DF, Yamauchi H, Broadwater G, Cirrincione CT, Rodrigue SP, Berry DA, et al. Circulating HER-2/erbB-2/c-neu (HER-2) Extracellular Domain as a Prognostic Factor in Patients with Metastatic Breast Cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 8662. *Clin Cancer Res* 2001;7(9):2703-11.
62. Arpino G, Green SJ, Allred DC, Lew D, Martino S, Osborne CK, et al. HER-2 Amplification, HER-1 Expression, and Tamoxifen Response in Estrogen Receptor-

Positive Metastatic Breast Cancer: A Southwest Oncology Group Study. *Clin Cancer Res.* 2004;10(17):5670-6.

63. Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, Qin L, Tsimelzon A, Huang S, et al. Tamoxifen Resistance in Breast Tumors Is Driven by Growth Factor Receptor Signaling with Repression of Classic Estrogen Receptor Genomic Function. *Cancer Res.* 2008;68(3):826-33.

64. Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;51(3):227-38.

65. Perou C, Sorlie T, Eisen M, van de Rijn M, Jeffrey S, Rees C, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747 - 52.

66. Iwase H, Zhang Z, Omoto Y, Sugiura H, Yamashita H, Toyama T, et al. Clinical significance of the expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  for endocrine therapy of breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003;52(1):34-8.

67. Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG, Cui Y, Allred DC, Horwitz KB, et al. Breast Cancer Patients with Progesterone Receptor PR-A-Rich Tumors Have Poorer Disease-Free Survival Rates. *Clin Can Res.* 2004;10(8):2751-60.

68. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics.* 2006;7:96.

69. Holst F, Stahl PR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, et al. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Genet.* 2007;39(5):655-60.

70. Francesca DA, Carmela G, Marta S, Marilena L, Salvatore P, Paola A, et al. A novel functional interplay between Progesterone Receptor-B and PTEN, via AKT, modulates autophagy in breast cancer cells. *J Cell Mol Med.* 2014;18(11):2252-65.

71. Amorim MAR, Guerra-Araiza C, Pernía O, da Cruz e Silva EF, Garcia-Segura LM. Progesterone regulates the phosphorylation of protein phosphatases in the brain. *J Neurosci Res.* 2010;88(13):2826-32.

72. Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 13):2375-82.

73. Lonning PE. Estradiol measurement in translational studies of breast cancer. *Steroids.* 2015;99(Pt A):26-31.

74. Yager JD. Mechanisms of estrogen carcinogenesis: The role of E2/E1-quinone metabolites suggests new approaches to preventive intervention--A review. *Steroids.* 2015;99(Pt A):56-60.

75. Coelingh Bennink F, Holinka CF, Visser M, Coelingh Bennink HJ. Maternal and fetal estetrol levels during pregnancy. *Climacteric.* 2008;11 Suppl 1:69-72.

76. Huss JM, Garbacz WG, Xie W. Constitutive activities of estrogen-related receptors: Transcriptional regulation of metabolism by the ERR pathways in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(9):1912-27.

77. Fact Sheets by Cancer 2015 [Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx?cancer=all#](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=all#) Consultado: agosto 2015.

78. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(8):1893-907.

79. Zahl PH, Maehlen J, Welch HG. The natural history of invasive breast cancers detected by screening mammography. *Arch Intern Med*. 2008;168(21):2311-6.
80. Colombia MdSPSd. Cáncer de mama, una enfermedad en ascenso en Colombia. *Boletín de prensa* 298 de 2014. 2014.
81. **Alejo Martínez H, Salazar Hurtado EJ, Poveda Suárez C, Puerto Jiménez D, Ramírez Campos F, Ol. RS.** Impacto del programa de aseguramiento de la calidad de las mamografías en Colombia. *An Radiol Mex* 2014; 13(4) : 369-383. 2014;13(4).
82. Font-Gonzalez A, University Medical Center Rotterdam R, The Netherlands, Piñeros M, Instituto Nacional de Cancerología B, Colombia, de Vries E, University Medical Center Rotterdam R, The Netherlands. Self-reported early detection activities for breast cancer in Colombia in 2010: impact of socioeconomic and demographic characteristics. *Salud pública Méx*. 2013;55(4):368-78.
83. Registro Poblacional de Cáncer de Cali 2015 [Available from: <http://rpcc.univalle.edu.co/>].
84. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
85. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013;63(1):11-30.
86. Buist DS, Abraham LA, Barlow WE, Krishnaraj A, Holdridge RC, Sickles EA, et al. Diagnosis of second breast cancer events after initial diagnosis of early stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;124(3):863-73.
87. Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degnim AC, Ghosh K, et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(3):229-37.
88. Sanders ME, Page DL, Simpson JF, Schuyler PA, Dale Plummer W, Dupont WD. Interdependence of radial scar and proliferative disease with respect to invasive breast carcinoma risk in patients with benign breast biopsies. *Cancer*. 2006;106(7):1453-61.
89. Colditz GA, Kaphingst KA, Hankinson SE, Rosner B. Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133(3):1097-104.
90. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58.209 women with breast cancer and 101.986 women without the disease. *Lancet*. 2001;358(9291):1389-99.
91. Sharif S, Moran A, Huson SM, Iddenden R, Shenton A, Howard E, et al. Women with neurofibromatosis 1 are at a moderately increased risk of developing breast cancer and should be considered for early screening. *J Med Genet*. 2007;44(8):481-4.
92. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*. 2003;72(5):1117-30.
93. Evans DG. Genetic predisposition to cancer. *Medicine*. 2012;40(1):29-33.

94. Anderson E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res.* 2002;4(5):197-201.
95. Britton JA, Gammon MD, Schoenberg JB, Stanford JL, Coates RJ, Swanson CA, et al. Risk of Breast Cancer Classified by Joint Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Status among Women 20–44 Years of Age. *Am J Epidemiol.* 2002;156(6):507-16.
96. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet Oncology.* 2012;13(11):1141-51.
97. Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer.* 1990;46(5):796-800.
98. Ritte R, Lukanova A, Berrino F, Dossus L, Tjonneland A, Olsen A, et al. Adiposity, hormone replacement therapy use and breast cancer risk by age and hormone receptor status: a large prospective cohort study. *Breast Cancer Res.* 2012;14(3):R76.
99. Surakasula A, Nagarjunapu GC, Raghavaiah KV. A comparative study of pre- and post-menopausal breast cancer: Risk factors, presentation, characteristics and management. *J Res Pharm Pract.* 2014;3(1):12-8.
100. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52?705 women with breast cancer and 108?411 women without breast cancer. *Lancet.* 1997;350(9084):1047-59.
101. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama.* 2002;288(3):321-33.
102. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet.* 2003;362(9382):419-27.
103. Shapiro S, Farmer RDT, Stevenson JC, Burger HG, Mueck AO, Gompel A. Does hormone replacement therapy (HRT) cause breast cancer? An application of causal principles to three studies. *J Fam Plann Reprod Health Care.* 2013;39(2):80-8.
104. Chlebowski RT, Manson JE, Anderson GL, Cauley JA, Aragaki AK, Stefanick ML, et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(8):526-35.
105. Li CI, Malone KE, Porter PL, Weiss NS, Tang MT, Cushing-Haugen KL, et al. Relationship between long durations and different regimens of hormone therapy and risk of breast cancer. *Jama.* 2003;289(24):3254-63.
106. Shah R, Rosso K, Nathanson SD. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol.* 2014;5(3):283-98.
107. Vatten L. [Female sex hormones increase the risk of breast cancer]. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 1998;118(19):2969-74.
108. González-Jiménez E, Universidad de Granada E, Montero-Alonso MÁ, Universidad de Granada E, Schmidt Riovalle J, Universidad de Granada E.

- Association between obstetric factors, hormone levels and nutritional status with the development of breast cancer. *Rev méd Chile*. 2013;141(12):1541-6.
109. Thomas DB, Rosenblatt KA, Ray RM, Tryggvadóttir L, Sigurvinsson T, Tulinius H, et al. RE: "BREASTFEEDING AND REDUCED RISK OF BREAST CANCER IN AN ICELANDIC COHORT STUDY". 2001.
110. Romieu I, Hernandez-Avila M, Lazcano E, Lopez L, Romero-Jaime R. Breast cancer and lactation history in Mexican women. *Am J Epidemiol*. 1996;143(6):543-52.
111. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*. 2002;360(9328):187-95.
112. De Silva M, Senarath U, Gunatilake M, Lokuhetty D. Prolonged breastfeeding reduces risk of breast cancer in Sri Lankan women: A case-control study. *Cancer Epidemiol*. 2010;34(3):267-73.
113. Clemons M, Goss P. Estrogen and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2001;344(4):276-85.
114. Sieri S, Krogh V, Bolelli G, Abagnato CA, Grioni S, Pala V, et al. Sex hormone levels, breast cancer risk, and cancer receptor status in postmenopausal women: the ORDET cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(1):169-76.
115. Kendall A, Folkard EJ, Dowsett M. Influences on circulating oestrogens in postmenopausal women: Relationship with breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;103(2):99-109.
116. Simonsson M, Markkula A, Bendahl PO, Rose C, Ingvar C, Jernstrom H. Pre- and postoperative alcohol consumption in breast cancer patients: impact on early events. *Springerplus*. 2014;3:261.
117. Bertram LC, Stefanick M, Saquib N, Natarajan L, Patterson R, Bardwell W, et al. Physical activity, additional breast cancer events, and mortality among early-stage breast cancer survivors: findings from the WHEL Study. *Cancer Causes & Control*. 2011;22(3):427-35.
118. Protani M, Coory M, Martin J. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;123(3):627-35.
119. Grossmann ME, Ray A, Nkhata KJ, Malakhov DA, Rogozina OP, Dogan S, et al. Obesity and breast cancer: status of leptin and adiponectin in pathological processes. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(4):641-53.
120. Fuentes-Mattei E, Velazquez-Torres G, Phan L, Zhang F, Chou PC, Shin JH, et al. Effects of obesity on transcriptomic changes and cancer hallmarks in estrogen receptor-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(7).
121. Henderson TO, Amsterdam A, Bhatia S, Hudson MM, Meadows AT, Neglia JP, et al. Systematic review: surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. *Ann Intern Med*. 2010;152(7):444-55; w144-54.
122. Guibout C, Adjadj E, Rubino C, Shamsaldin A, Grimaud E, Hawkins M, et al. Malignant breast tumors after radiotherapy for a first cancer during childhood. *J Clin Oncol*. 2005;23(1):197-204.

123. Preston DL, Ron E, Tokuoka S, Funamoto S, Nishi N, Soda M, et al. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. *Radiat Res.* 2007;168(1):1-64.
124. Pukkala E, Kesminiene A, Poliakov S, Ryzhov A, Drozdovitch V, Kovgan L, et al. Breast cancer in Belarus and Ukraine after the Chernobyl accident. *Int J Cancer.* 2006;119(3):651-8.
125. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(10):955-60.
126. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2009;360(8):790-800.
127. Reis-Filho JS, Weigelt B, Fumagalli D, Sotiriou C. Molecular Profiling: Moving Away from Tumor Philately. *Sci Transl Med.* 2010;2(47):47ps3.
128. Sonnenblick A, Fumagalli D, Sotiriou C, Piccart M. Is the differentiation into molecular subtypes of breast cancer important for staging, local and systemic therapy, and follow up? *Cancer Treat Rev.* 2014;40(9):1089-95.
129. O'Brien KM, Cole SR, Tse C-K, Perou CM, Carey LA, Foulkes WD, et al. Intrinsic Breast Tumor Subtypes, Race, and Long-Term Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clin Cancer Res.* 2010;16(24):6100-10.
130. Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Kim SI, et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast.* 2012;21(1):50-7.
131. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869-74.
132. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 22. England2011. p. 1736-47.
133. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol.* 2005;23(29):7350-60.
134. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011;5(1):5-23.
135. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(10):736-50.
136. Turner N, Pearson A, Sharpe R, Lambros M, Geyer F, Lopez-Garcia MA, et al. FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* 2010;70(5):2085-94.
137. Pathmanathan N, Provan PJ, Mahajan H, Hall G, Byth K, Bilous AM, et al. Characteristics of HER2-positive breast cancer diagnosed following the introduction of universal HER2 testing. *Breast.* 2012;21(6):724-9.
138. Jones RL, Constantinidou A, Reis-Filho JS. Molecular Classification of Breast Cancer. *Surg Pathol Clin.* 2012;5(3):701-17.
139. Bandyopadhyay S, Ali-Fehmi R. Breast Carcinoma: Molecular Profiling and Updates. *Clin Lab Med.* 2013;33(4):891-909.

140. Wiechmann L, Sampson M, Stempel M, Jacks LM, Patil SM, King T, et al. Presenting features of breast cancer differ by molecular subtype. *Ann Surg Oncol*. 2009;16(10):2705-10.
141. García Ó, Ossa CA, Beltrán MI, Cano M, Villamizar L, Arias AM. Descripción de una cohorte de pacientes con cáncer de mama triple-negativo subtipo basal-like, atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología y en el Hospital de San José durante el periodo 2006-2008. *Rev Colomb Cancerol*. 2012;16(2):91-9.
142. Ramos PL. Características clínicas y demográficas en pacientes con cáncer de mama triple negativos, clínica oncocare, 2004-2012. *Rev Colomb Cancerol*. 2013;17(4):180.
143. Sardiñas Ponce R. Autoexamen de mama: Un importante instrumento de prevención del cáncer de mama en atención primaria de salud. *Rev haban cienc méd* 2009;8:0-.
144. Cancer IoMUaNRUCotEDoB, Patlak M, Nass SJ, Henderson IC, Lashof JC. Mammography and Beyond: A summary of a study by the institute of medicine. 2001 2001. National Academies Press (US). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> Acceso: Octubre 2015.
145. Á S, J R. **La mamografía como método de tamizaje para el cáncer de seno en Colombia.** *rev colomb cir*. 2005;20(3).
146. Serrano Vicente J, Infante de la Torre JR, Domínguez Grande ML, García Bernardo L, Durán Barquero C, Rayo Madrid JI, et al. Optimización de la biopsia selectiva de ganglio centinela en el cáncer de mama mediante palpación axilar intraoperatoria. *Rev Esp Med Nucl*. 2010;29(01):8-11.
147. Barrón-González A, Secretaría de Salud M, México, Arias-Martínez J, Secretaría de Salud M, México, Castro-Romero I, Secretaría de Salud M, México. Antiestrógenos: mecanismo de acción y aplicaciones clínicas. *Salud pública Méx*. 2001;43(6):577-84.
148. Powles TJ, Ashley S, Tidy A, Smith IE, Dowsett M. Twenty-year follow-up of the Royal Marsden randomized, double-blinded tamoxifen breast cancer prevention trial. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(4):283-90.
149. Lumachi F, Brunello A, Maruzzo M, Basso U, Basso SM. Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Curr Med Chem*. 2013;20(5):596-604.
150. Sapino A, Pietribiasi F, Bussolati G, Marchisio PC. Estrogen- and tamoxifen-induced rearrangement of cytoskeletal and adhesion structures in breast cancer MCF-7 cells. *Cancer Res*. 1986;46(5):2526-31.
151. Kim SH, Lee SU, Kim MH, Kim BT, Min YK. Mitogenic estrogen metabolites alter the expression of 17beta-estradiol-regulated proteins including heat shock proteins in human MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cells*. 2005;20(3):378-84.
152. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics: BioMed Central Ltd*; 2012. p. 134.
153. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(9):e36.
154. Bockstaele L, Boulenouar S, Van Den Steen G, Dechene J, Tsepelidis S, Craciun L, et al. Evaluation of quantitative polymerase chain reaction markers for

- the detection of breast cancer cells in ovarian tissue stored for fertility preservation. *Fertil Steril*. 2015;104(2):410-7.e4.
155. Koh EH, Cho YW, Mun YJ, Ryu JH, Kim EJ, Choi DS, et al. Upregulation of human mammaglobin reduces migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Invest*. 2014;32(1):22-9.
156. Zafrakas M, Petschke B, Donner A, Fritzsche F, Kristiansen G, Knüchel R, et al. Expression analysis of mammaglobin A (SCGB2A2) and lipophilin B (SCGB1D2) in more than 300 human tumors and matching normal tissues reveals their co-expression in gynecologic malignancies. *BMC Cancer*. 2006;6.
157. Brown NM, Stenzel TT, Friedman PN, Henslee J, Huper G, Marks JR. Evaluation of expression based markers for the detection of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2006;97(1):41-7.
158. Culleton J, O'Brien N, Ryan BM, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, et al. Lipophilin B: A gene preferentially expressed in breast tissue and upregulated in breast cancer. *Int J Cancer*. 2007;120(5):1087-92.
159. Sjodin A, Guo D, Hofer PA, Henriksson R, Hedman H. Mammaglobin in normal human sweat glands and human sweat gland tumors. *J Invest Dermatol*. 2003;121(2):428-9.
160. Onuma K, Dabbs DJ, Bhargava R. Mammaglobin expression in the female genital tract: Immunohistochemical analysis in benign and neoplastic endocervix and endometrium. *Int J Gynecol Pathol*. 2008;27(3):418-25.
161. Picot N, Guerrette R, Beauregard AP, Jean S, Michaud P, Harquail J, et al. Mammaglobin 1 promotes breast cancer malignancy and confers sensitivity to anticancer drugs. *Mol Carcinog*. 2015.
162. Pietras RJ, Marquez-Garban DC. Membrane-associated estrogen receptor signaling pathways in human cancers. *Clin Cancer Res*. 2007;13(16):4672-6.
163. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;354(3):270-82.