



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES
HERMANAS INDUCIDOS POR EL
TRATAMIENTO EN PACIENTES CON
CÁNCER DE MAMA

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
JIMENA GARIBAY GARCIA

TOLUCA, MÉXICO, MARZO 2013

DIRECTOR DE TESIS
DRA. JULIETA CASTILLO CADENA
ASESOR
M.O. PAULA A. CABRERA GALEANA





Toluca, México, 1º de febrero de 2013

P. QFB. JIMENA GARIBAY GARCÍA

FACULTAD DE QUÍMICA, UAEM.

PRESENTE

La Dirección de la Facultad de Química de la UAEM, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación Profesional, en la modalidad **TESIS**, estará formado por:

Dr. JUAN CARLOS SÁNCHEZ MEZA

PRESIDENTE

Dr. JULIETA CASTILLO CADENA

PRIMER VOCAL

Dr. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN

SEGUNDO VOCAL

QFB. CONRADO EMILIO URÍA GÓMEZ

TERCER VOCAL

M. en C. Q. JONNATHAN GUADALUPE SANTILLÁN BENÍTEZ

SECRETARIO

Dra. MARÍA DEL SOCORRO CAMARILLO ROMERO

SUPLENTE

Dra. ENEYDA DEL SOCORRO CAMARILLO ROMERO

SUPLENTE

Sin más por el momento le envío un respetuoso saludo.

ATENTAMENTE

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2013, 50 Aniversario Luctuoso del Poeta Heriberto Enriquez"

M. en A. P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARÍA GONZÁLEZ

DIRECTORA



U. A. E. M.
FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCION

c.c.p. Expediente.
c.c.p. Archivo.



“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas. Ahora sabemos que está en nuestros genes.” (J. Watson)



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Julieta Castillo, por no solo iniciarme en el maravilloso camino de la citogenética, sino guiarme a través de él.

A la Dra. Paula Cabrera, al Dr. Gabriel Tellez y todos en oncomédica, por abrirme las puertas de sus consultorios y empaparame de sus conocimientos y experiencia.

A la Dra. Regina Rodríguez por ayudarme tanto en el poco tiempo que pasé en su laboratorio, sin usted no habría visto intercambio alguno.

A todos en el laboratorio de genética, por sus pláticas, risas y comentarios, que añadieron a mi paso por el laboratorio ese extra que toda experiencia necesita.

A mis revisores, por darme una pequeña pista acerca de lo que debía mejorar en mi investigación y redacción.

La presente investigación fué realizada con apoyo de la beca “Apoyo a la investigación” po parte del SIEA, UAEM.

La impresión de esta Tesis se realizó con apoyo del PIFI 2012.

DEDICATORIAS

A mis padres,

su paciencia, amor y cuidado, es lo que me mantiene siempre buscando lo que hay más allá del horizonte, sin ustedes nada de esto habría sido posible.

A Dan,

mi amigo no. 1, con tus bromas y locuras eres el primero en mostrarme lo divertido que es aprender.

A mi chico X,

no solo hiciste el diseño, además mantuviste mi mente abierta a todas las posibilidades y a mi conciencia en las noches en vela.

A quienes me acompañaron, ayudaron e impulsaron durante todo el camino y aún antes: Karla, Caro, Lalis.

ÍNDICE

INTRODUCCION	6
CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO	
1. INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDES HERMANAS	10
1.1 Historia	10
1.1.1 Usos posteriores	10
1.2 Definición	11
1.3 Mecanismos de formación	12
1.4 Ventajas y desventajas	13
1.5 Accesibilidad a tejidos con ICH	14
1.6 Ensayo de ICH	14
1.6.1 Cultivo de linfocitos de sangre periférica	14
1.6.2 Ciclo celular	14
1.6.3 Captación de BrdU en la síntesis de ADN	15
1.6.4 Concentración de BrdU	17
1.6.5 Tiempo de adición de la Fitohemaglutinina	17
1.6.6 Estudios de ICH “ <i>in vivo</i> ”	17
1.6.4 Concentración de BrdU	18
1.6.5 Tiempo de adición de la Fitohemaglutinina	18
1.6.6 Estudios de ICH “ <i>in vivo</i> ”	18
2. OTRAS ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS GENÉTICO	19
2.1 Índice de replicación	19
2.2 Índice mitótico	19
2.3 Índice de proliferación celular	20
3. CÁNCER	21
3.1 Protooncogenes, Oncogenes y Genes supresores de tumores.	22
3.2 Tipos de Carcinógenos	23
3.3 Mecanismos de reparación	23
3.4 La Inmortalización de células cancerosas	24
4. CÁNCER MAMARIO	25
4.1 Estructura anatómica de la glándula mamaria	25
4.1.1 Estructura interna	25
4.2 Epidemiología	26
4.2.1 Mortalidad	27
4.2.2 Morbilidad	28
4.3 Factores de riesgo	29
4.4 Clasificación	29

4.4.1 Clasificación general	29
4.4.2 Sistema TNM de estadificación	31
5. TRATAMIENTO	33
5.1 Radioterapia	34
5.2 Quimioterapia	34
5.2.1 Fármacos quimioterapéuticos	35
5.3 Hormonoterapia	37
5.4 Inmunoterapia	37
CAPÍTULO 2	
1. ANTECEDENTES	40
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
3. JUSTIFICACIÓN	42
4. HIPÓTESIS	42
5. OBJETIVO GENERAL	42
5.1 Objetivos Específicos	42
CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODO	
1.1 Población en estudio	46
1.2 Criterios de selección	46
1.3 Técnica	46
1.3.1 Toma de muestra	46
1.3.2 Siembra	47
1.3.3 Cosecha	47
1.3.4 Preparación de laminillas	47
1.3.5 Tinción diferencial	47
1.3.6 Medición de índices	48
1.3.6.1 Índice de ICH	48
1.3.6.2 Índice de replicación	49
1.3.6.3 Índice mitótico	49
1.3.6.4 Índice de proliferación celular	50
1.4 Análisis estadístico	50
CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
2. CONCLUSIONES	63
3. RECOMENDACIONES	63
REFERENCIAS	64
ANEXOS	

INTRODUCCION

En 1978, Victor Richards dijo:

Las células cancerosas están demasiado vivas, tienen una locura por vivir y por su propia reproducción, pero tienen una forma de vida totalmente egoísta, despreocupada del bienestar del organismo en el cual habitan. Se dividen y reproducen a sí mismas sin ningún orden ni propósito específico, invadiendo órganos y tejidos vecinos. En su necesidad de “espacio vital” alcanzan partes muy lejanas del cuerpo en el que viven, viajando a través de la sangre y los vasos linfáticos. Muestran completo desprecio por el derecho de las demás células de llevar a cabo sus tareas sin interferencias, si no se les detiene en el destructivo curso de su descontrolada proliferación, todo terminará en la muerte del organismo. La vida y no-vida parecen estar unidas en la identidad de la célula cancerosa.

“Cáncer” es un término que se usa para enfermedades en las que células anormales se dividen sin control, anárquicamente, produciendo millones de células que formarán así un tumor. Además, las células cancerosas pierden su especialización. Se dice que se “desdiferencian”. Finalmente, pueden migrar, produciendo la metástasis (Instituto Nacional del Cáncer, 2011).

Entre las terapias más utilizadas para tratar el cáncer mamario está la de Ciclofosfamida-Adriamicina(A/C), fármacos que ejercen efecto por disrupción del ADN que lleva a la muerte celular, lo que genera el control de la enfermedad; además de una gran cantidad de efectos adversos difíciles de sobrellevar para los pacientes. Se encontró que la Ciclofosfamida, entre otros fármacos quimioterapéuticos, induce Intercambios de Cromátides Hermanas (ICH), un biomarcador sensible para efectos carcinogénicos y/o mutagénicos de xenobióticos. El Índice de Replicación (IR) indica la replicación celular en cierto tiempo y con ello si está alargándose el ciclo celular debido a algún agente. El Índice Mitoótico (IM) e Índice de Proliferación Celular (IPC) dan una idea de la velocidad de división del cultivo y con ello la salud del mismo. El objetivo de éste estudio es determinar si los ICH e IR pueden ser indicadores tempranos de la respuesta al tratamiento en el cáncer mamario.

Con ese propósito, se examinaron muestras de 17 pacientes del Centro Oncológico Estatal del ISSEMyM, con una edad promedio 47 años. Estas pacientes habían sido diagnosticadas con cáncer mamario en estadios IIA, IIIA, IIB, IIIB y dos casos no etapificables. Todas ellas tuvieron respuesta clínica favorable al final del tratamiento. Se determinó la frecuencia de ICH, IR, IM e IPC antes e inmediatamente después de la terapia.

Se tuvo un promedio de ICH de 0.642 antes de la quimioterapia (aQT) y de 1.634 después de la quimioterapia (dQT); una mediana de IR de 1.44 aQT contra una de 1.16 dQT; una mediana de IM de 1.3 aQT y una de 0.38 dQT; una media de IPC de 35.19% aQT contra 28.30% dQT. Se encontró también presencia de poliploidías en cultivos de la primera toma en 7 pacientes. Para comparar los resultados de antes contra después de la quimioterapia se aplicó la t Pareada para ICH mostrando diferencia ($p=0.010$) al igual que el IPC ($p<0.001$); y la prueba de Wilcoxon para IR dio diferencia significativa ($p<0.001$) pero no así para el IM ($p=0.959$).

Estos resultados indican que los biomarcadores probados pueden servir como indicadores para la evaluación temprana del tratamiento, sin embargo hace falta conocer su comportamiento en pacientes que no han tenido buena respuesta al tratamiento con A/C.



CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1. INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDES HERMANAS

1.1 Historia

El Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) fue predicho por McClintock en 1938 a partir de sus observaciones sobre el comportamiento de los cromosomas dicéntricos en anillo en células somáticas del maíz para más tarde ser observado por primera vez por Taylor et. al. en 1957, cuando trabajaba marcando cromátides con timidina tritiada, encontró que los cromosomas metafásicos de la segunda generación celular mostraban una cromátides marcada y otra sin marcar, además de que en algunos casos se observaba un intercambio complementario del patrón de marcaje en las células analizadas.

Más tarde, en 1972, Zakharov y Egolina encontraron que en presencia de un análogo de la timidina llamado 5-bromodesoxiuridina (BrdU) durante la replicación del ADN da a lugar a cromosomas cuyas cromátides están formadas por una o ambas cadenas en las que la timina ha sido substituida por 5-BrdU. Tras teñir dichos cromosomas adecuadamente con tal de obtener una tinción diferencial de las cromátides, se detecta la diferenciación en cuanto a la bromosustitución TT, BT o BB, donde TT representa un cromosoma con ambas cromátides compuestas por timina y BB es uno con 5-BrdU, y con ello detectar si se ha producido o no un intercambio entre las cromátides hermanas (Ortiz R. et al 2006).

Entre 1973 y 1974, Latt demostró que la tinción con un fluorocromo, el Hoechst 33258 permitía distinguir por su menor grado de fluorescencia los cromosomas BB de las TT o BT con el impedimento de que debía contarse con un microscopio de fluorescencia por lo que Perry y Wolf (1974) modificaron la técnica añadiendo una tinción con Giemsa posterior a la tinción con Hoechst 33258 con lo que es posible observar las diferencias por medio de un microscopio óptico.

Posteriormente, en 1977, Schvartzman y Cortéz introdujeron modificaciones a la técnica que consistían en calentar a 55°C, solución salina de citrato después de la tinción del material con Hoechst y su exposición a la luz UV, para después teñirlo con Giemsa, consiguiendo en todos los casos una buena diferenciación. Debe tomarse en cuenta que la exposición a luz visible produce la formación de los ICH tanto como el tratamiento con BrdU (Ortiz R. et al 2006).

Más tarde se propusieron diversas estrategias para lograr la incorporación continua de la BrdU para efectuar análisis no solo *in vitro*, sino también *in vivo*, por ejemplo, Morales- Ramirez en 1980 propuso una sola inyección intraperitoneal de BrdU adsorbida a carbón activado (Ortiz R. et al 2006).

1.1.1 Usos posteriores

Los ICH son eventos que representan el intercambio simétrico, entre loci homólogos, de productos de replicación (Norppa H. 2004). Teóricamente no existe pérdi-

da de ADN ni cambios en la morfología cromosómica por lo que no representan situaciones letales para la célula y no pueden ser considerados mutaciones, ya que en principio, no producen cambios en la información genética. Sin embargo, se ha observado que la frecuencia de ICH aumenta cuando las células son expuestas a diversos agentes.

Se han investigado factores del estilo de vida, exposiciones ocupacionales, enfermedades y exposiciones terapéuticas. Existen muchos agentes externos cuyo contacto con el hombre causan un incremento en la frecuencia de ICH, por ejemplo se ha detectado que los fumadores tienen un 20% más ICH que los no fumadores (Lambert B. et al, 1982; Anderson D. et al, 1986), además en algunos estudios se ha encontrado una asociación positiva entre los ICH y la edad (Hulka B. S. et al, 1990). Estudios indican que las mujeres tienen 10% más ICH que los hombres (Anderson D. et al 1986; Bender M. A. et al, 1988). Estudios preliminares de Tucker et al (1987) han sugerido que la frecuencia de ICH tiene tres picos durante el ciclo menstrual. Estos científicos también han debatido acerca del incremento de ICH por embarazo y uso de anticonceptivos orales.

Hablando de las enfermedades congénitas podemos mencionar el síndrome de Bloom, la xerodermia pigmentosa (Wolf-Dieltrich 2004) y la enfermedad de Behcet (Ikbal M. et al, 2006). También se han estudiado casos de esclerosis múltiple (Kärki N. T. et al, 1986) en los que los niveles de ICH eran significativamente mayores comparados con los controles (Hulka B. S. et al, 1990).

Su aumento también ha sido relacionado con cáncer. En el 2008, Karaman A. et al, observaron que en casos de cáncer gástrico y gastritis atrófica crónica con y sin la presencia de infección por *H. pylor*, la media de frecuencias de ICH eran significativamente más altas que las del grupo control.

En cuanto a agentes mutagénicos, se tiene el ejemplo de la mitomicina C, se ha encontrado que dicho agente aumenta significativamente la frecuencia de ICH en cultivos de linfocitos humanos, con un aumento máximo de 24 ICH, aumento constante con respecto a la dosis empleada. En éste estudio se analizaron también índice mitótico e índice de proliferación celular encontrando un retraso en el ciclo de división y la inhibición de la división celular en un 50% aproximadamente en la dosis más alta (Madrigal E. et al, 1996). Se tiene también el caso de la investigación hecha por Tirado et al (2005), en dicha investigación se buscaba el daño causado por metales pesados por medio de ICH y micronúcleos, encontrando además de incremento en la frecuencia de ICH por el daño genotóxico, un considerable porcentaje de células con alta frecuencia de ICH, es decir más de 10 ICH por célula.

1.2 Definición

La división mitótica de una célula da lugar a dos células hijas, cada una de las cuales es idéntica genéticamente a la célula madre. Durante la mitosis el material genético se condensa y se duplica, formando los cromosomas, en cada cromosoma ambas copias se denominan cromátides hermanas y están unidas entre ellas por medio del centrómero, más tarde, durante la anafase, se separan las cromátides hermanas de

cada cromosoma de modo que el resultado final consiste en la formación de dos células hijas genéticamente idénticas, a partir de una célula original.

La ruptura y posterior unión de las cromátides de un cromosoma en la estructura de su “hermana” es conocida como Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH o SCE, Sister Chromatid Exchange) y puede darse ya sea entre cromátides hermanas de una tétrada meiótica o entre las de un cromosoma somático duplicado.

En este caso, el corte y unión del ADN produce dos moléculas idénticas, ya que una es copia de la otra y se encuentran unidas en el mismo punto, el intercambio no entraña ningún cambio en la disposición de los genes, tampoco hay efecto alguno sobre el fenotipo de la progenie, en realidad se puede decir que demuestra que los mecanismos intracelulares de reparación del ADN están funcionando correctamente; este tipo de corte y unión es solamente identificable por métodos especiales que marquen el ADN durante su duplicación (Solari A. J. 2004, Eynard A. 2008).

La replicación del ADN tiene lugar durante la fase de síntesis (S). Durante la fase G2 (intervalo entre la fase S y la siguiente mitosis), se lleva a cabo parte de la reparación del ADN y la preparación de la célula para la mitosis. Cuando se alcanza la fase G2, la célula contiene dos copias idénticas de cada uno de los 46 cromosomas. Las cromátides hermanas suelen intercambiar material durante la fase S, o después de la misma (Repetto M. 1995). Se considera el momento de la síntesis de ADN como periodo en el que se producen los ICH, cuando las cadenas homologas están lo suficientemente unidas para lograr la ruptura en ambas cromátides en localización coincidente, equivalente y simétrica (Latt y Schreck, 1980). Entre los factores que inducen estas estructuras están la exposición a luz ultravioleta, las radiaciones ionizantes y otros agentes mutagénicos como medicamentos, bebidas alcohólicas, el fumar, consumo de té, café, cocoa, (Renner 1982), enfermedades virales como la hepatitis, herpes e influenza (Crossen 1972) y es particularmente alta en el Síndrome de Bloom, todos estos factores tienen en común que producen un defecto en los procesos de reparación del ADN. La inducción de aumento de ocurrencia de este fenómeno durante la mitosis se interpreta como mutagenicidad o carcinogénesis (Ortiz R. et al 2006).

1.3 Mecanismos de formación

Se han propuesto dos grandes modelos teóricos de la formación de ICH: El modelo de recombinación está basado en el intercambio de cromátides como parte del proceso de reparación posterior a la replicación (Bender M. A. et al, Kato H. 1977), mientras que el modelo de replicación implica la recombinación al tiempo en que el ADN se replica (Painter, 1980; Ishii and Bender, 1980), en todo caso, es plenamente aceptado que los ICH reflejan procesos distintos a los que producen aberraciones cromosómicas (Lacadena 1996).

El mecanismo de formación más aceptado es el modelo de replicación, basado en roturas de doble cadena que ocurren durante la replicación del ADN con la intervención de topoisomerasas que unen las cadenas recién sintetizadas de las regiones ya replicadas con las cadenas aun sin replicar como lo muestra la figura 1. (Hulka B. S. et al, 1990).

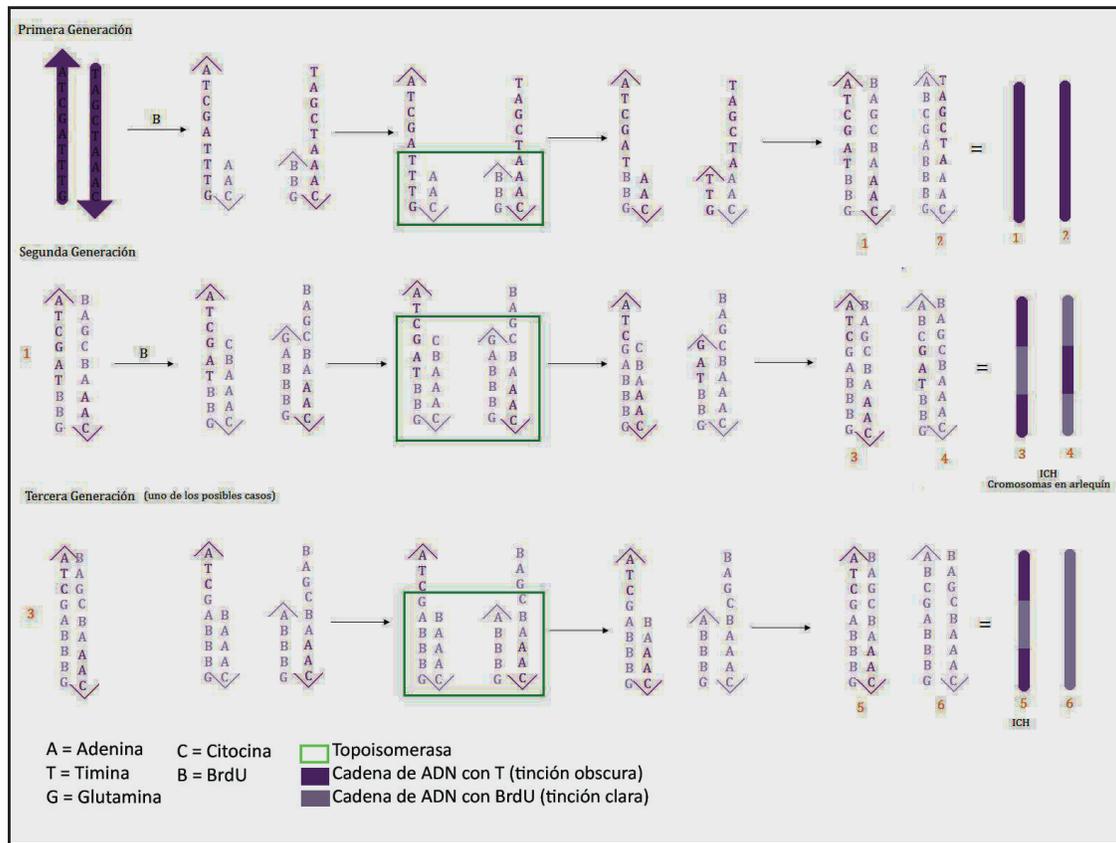


Figura 1. Modelo de Painter del mecanismo molecular que produce los ICH (1980, 1982).

Tras dos rondas de replicación en presencia de BrdU y debido a la fotólisis del ADN bromosustituido, las cromátides BB se tiñen menos que los BT apareciendo en las preparaciones un contraste de tinción pálida y oscura en los respectivos tipos de cromátides. Cuando se producen las ICH los cromosomas aparecen con segmentos alternantes pálidos y oscuros que les confieren un aspecto característico, son los cromosomas arlequinados.

Generalmente la evaluación del daño genotóxico a través de ICH se hace en metafases de segundo ciclo de duplicación. En otros estudios para evaluar los mecanismos de formación de los mismos y el ciclo de duplicación en que se formaron, se ha implementado un análisis de tres tonos que implica la duplicación celular en presencia de diferentes concentraciones de BrdU en tres ciclos consecutivos, mediante la cual se pueden determinar los ICH correspondientes al primero, segundo y tercer ciclo (Ortiz R. et al 2006).

1.4 Ventajas y desventajas

Se considera que el uso del método de detección de daño genotóxico por análisis de ICH tiene más pros que contras, ya que es excelente para detectar agentes que producen aductos de ADN, es mucho más sensible para detectar diversos mutágenos químicos en comparación con el análisis de aberraciones cromosómicas, hay métodos tanto *in vivo* como *in vitro* para detectar mutágenos directos e indirectos, permite el análisis en diversos tejidos por medio del uso de sistemas *in vivo*, se puede detec-

tar en distintos organismos incluidos plantas y animales, los cuales pueden usarse como indicadores ambientales de agentes genotóxico. Es un método relativamente rápido y tiene gran reproducibilidad.

Por otro lado, entre sus desventajas están la discrepancia en relación con su significado biológico, la falta de correlación del número de ICH con el número de lesiones y el efecto aditivo o sinérgico que puede tener el BrdU con el mutágenos (Ortiz R. et al 2006).

1.5 Accesibilidad a tejidos con ICH

A pesar de que aparentemente los ICH ocurren en cualquier célula del cuerpo, la mayoría de los estudios en humanos se enfocan en linfocitos circulantes. Se toma en cuenta que las exposiciones a mutágenos que incrementan los niveles de ICH en linfocitos también afectan otras células, por ejemplo formadoras de tumores, por lo tanto las ICH de linfocitos deben ser buenos marcadores biológicos. También se toma en cuenta que la obtención de muestras de linfocitos circulantes en sangre es menos invasiva que la de la mayoría de las demás células de interés (Hulka B. S. et al, 1990).

1.6 Ensayo de ICH

1.6.1 Cultivo de linfocitos de sangre periférica

Se calcula que del 20-30% de las células blancas son linfocitos, células necesarias para el ensayo. Después de haber tomado una muestra de sangre periférica, se coloca en el medio de cultivo el cual contiene nutrientes, BrdU y fitohemaglutinina (PHA), el cual es un mitógeno que estimula linfocitos, en especial células T, a que se dividan. Se recomienda que la duración del cultivo sea de 72 horas ya que se necesita que haya un alto porcentaje de metafases de células en su segunda división. Pasado el tiempo de cultivo, se cosechan las células deseadas mediante un tratamiento de centrifugado y lavados con solución de KCl y fijador Carnoy (ácido acético-metanol), para el posterior montaje en portaobjetos y tinción. En algunos casos, y dependiendo de las preferencias del investigador, se separa el plasma con las células blancas por centrifugación y se siembra únicamente esa fracción en el medio de cultivo y demás soluciones. Se ha reportado la existencia de células en primer, segundo y tercer ciclo de replicación en un tiempo específico de cultivo, estas proporciones pueden ser interpretadas como indicadores de citotoxicidad o retraso mitótico (Hulka B. S. et al, 1990).

1.6.2 Ciclo celular

El ciclo celular es una secuencia ordenada de eventos que conducen a la proliferación y división celular en la que una célula madre da lugar a dos células hijas. Se divide en dos fases, la interfase, en la que se replica el material genético y la fase M o mitosis, que es la fase de división celular que incluye la mitosis (Medmol, 2007).

La interfase, a su vez, se divide en 3 fases: G1, S y G2. En la fase G1 (Growth 1) la célula crece, aumentando su masa celular. Durante ésta fase, la célula es sensible a señales externas que inducen o inhiben la proliferación celular, como hormonas, factores de crecimiento o mitógenos como la PHA en el caso de los linfocitos. Le sigue la fase S (Synthesis), que es la fase de replicación del ADN. Así, un organismo diploide ($2n$) pasa a ser tetraploide ($4n$). Finalizando con la fase G2, una fase de preparación para la mitosis, donde ocurre la reparación del ADN (Díaz et. al, 2010).

La fase M incluye la mitosis durante la cual se lleva a cabo el reparto del material genético duplicado de la célula madre entre dos células hijas, y la citocinesis que se refiere al reparto de citoplasma entre las dos células hijas (Medmol, 2007).

Existe una fase, llamada G0, de quiescencia permanente o temporal, en la que se detiene el ciclo celular. Se considera una fase de latencia, mas no de reposo ya que las células son metabólicamente activas (Contreras et. al, 2009). En esta fase quedan detenidas aquellas células que no se van a volver a dividir así como aquellas que necesitan estímulos externos o internos específicos para entrar en división (Medmol, 2007).

Al final de cada fase se encuentra cada uno de los tres puntos de control, en los que la célula examina las condiciones externas e internas y decide pasar o no a la siguiente fase (Müller- Sterl, 2008). En G1 tardía, se verifica si se ha alcanzado el crecimiento adecuado y si no hay daño en el ADN. En el final de G2 se verifica si el ADN se ha replicado completamente y sin daños, si hay daños se reparan. Y el último punto de control al final de la fase M, verifica la correcta unión de las dos composiciones de cromosomas en el huso mitótico. La pérdida de estos controles conduce a que muchas células continúen el ciclo celular aún en condiciones en las que no deberían hacerlo como por ejemplo cuando tienen su ADN dañado. Esto puede producir una proliferación descontrolada de células que puede causar tumores (Medmol, 2007; Díaz et. Al, 2010). También existen los puntos de restricción los cuales ocurren cuando las células cumplen con los requerimientos óptimos para seguir con el ciclo (Contreras et. al. 2009).

1.6.3 Captación de BrdU en la síntesis de ADN

Es bien sabido que las células pasan por un periodo en el ciclo celular en el que se replican los cromosomas, y con ellos el ADN, la fase S. En las condiciones del ensayo, durante esta fase el BrdU reemplaza parcialmente a la timidina, base que forma parte de los componentes del cromosoma normal. Dentro del cultivo, durante la metafase, cada cromátide hermana tiene una hebra recién formada por ADN sustituido con BrdU y una hebra molde, formada por ADN normal (Figura 2):

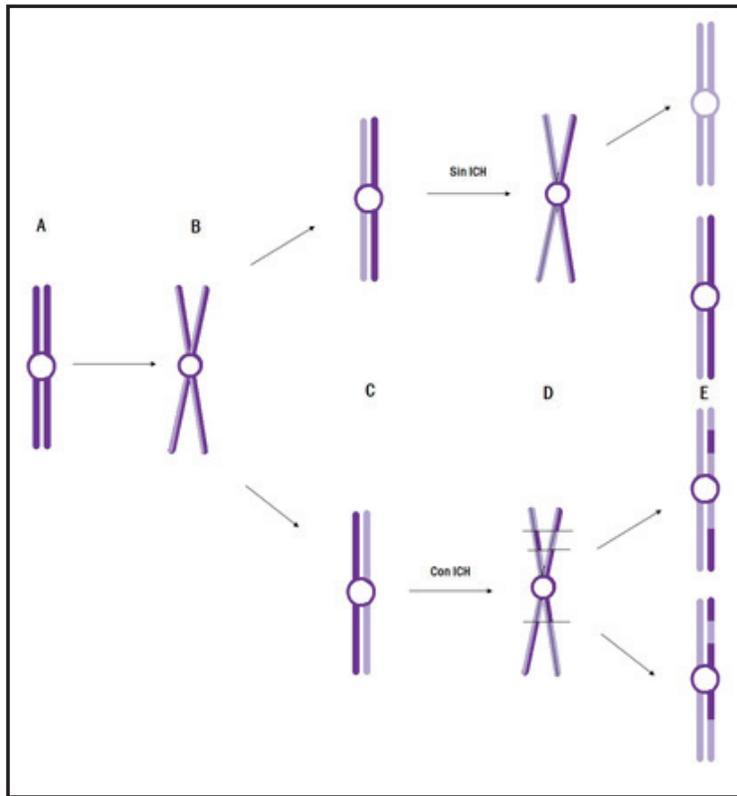


Figura 2. Modelo de captación de BrdU por los cromosomas en replicación.

A – Durante la fase G₀, el cromosoma tiene dos “brazos”, cada uno tiene dos hebras de ADN.

B – Cuando la célula entra en la primera metafase durante el cultivo, cada cromosoma se replica en presencia de BrdU formando un par de cromátidos hermanos. Las cadenas de ADN recién formado, indicadas por el tono más claro, incorporan BrdU; la hebra molde está indicada con el tono oscuro. Cada cromátide hermana en la metafase del primer ciclo contiene una hebra substituida con BrdU y una molde.

C – Después de la mitosis, cada una de las dos células hijas tiene una hebra de ADN molde y una hebra de ADN substituida con BrdU.

D – Cuando las células hijas entran a la metafase del segundo ciclo de división, una de las cromátides hermanas incluye una hebra de ADN molde y una hebra de ADN substituida con BrdU; la otra cromátide hermana contiene dos hebras de ADN substituido con BrdU. La distribución asimétrica en la segunda metafase permite la visualización de las ICH: la cromátide que contiene el ADN molde es de diferente intensidad comparada con la que está substituida con BrdU en ambas hebras. Los ICH se observan en el microscopio como una discontinuidad de la intensidad de la cromátide como se muestra en el cromosoma de abajo, en el que se muestran tres ICH.

E – Después de la segunda mitosis, la célula hija tiene sustitución de BrdU como es mostrado.

1.6.4 Concentración de BrdU

Dado que el BrdU causa ICH por si mismo dependiendo de la dosis, su concentración en el cultivo es un factor de gran importancia en la determinación de las bases de la medición de ICH (Crossen P. E, 1982; Lambert B. et al, 1982). La inducción de ICH con BrdU aparentemente depende de la relación entre la concentración de BrdU y el número de células en división en el cultivo, de modo que debe estandarizarse esta relación, de otra forma las células estarán compitiendo por la cantidad dada de BrdU (Hulka B. S. et al, 1990).

1.6.5 Tiempo de adición de la Fitoheماغlutinina

Para estimular la mitosis, se agrega un mitógeno, normalmente Fitoheماغlutinina (PHA), al cultivo. El tiempo de adición de éste, ya sea si es agregado a la sangre total o al cultivo de células separadas previamente, puede afectar la frecuencia de ICH (Lambert B. et al, 1982). De acuerdo a estos investigadores, la selección diferencial de las subclases de linfocitos debe ser tomada en cuenta para la observación.

Los cultivos de linfocitos contienen células T, B y otras subclases, todas ellas deben su proliferación a diferentes mitógenos específicamente. El tiempo de vida media de cada una de las subclases es diferente, la prevalencia detectable de las lesiones del ADN debidas a exposición pueden depender de los tipos de linfocitos que fueron estimulados. La mayoría de los estudios en humanos están basados en linfocitos T ya que la PHA estimula principalmente esta subclase. A pesar de la posible selección diferencial de los linfocitos puede ser inconveniente, la comparación de las subclases podría, teóricamente, permitir uso de marcadores en las células con diferentes tiempos de vida media para estimar el tiempo de exposición (Hulka B. S. et al, 1990).

1.6.6 Estudios de ICH *in vivo*

Los estudios de ICH *in vivo* se han realizado durante mucho tiempo, tanto en mamíferos como en no mamíferos. En estos protocolos se expone a los animales tanto al agente de interés como al BrdU (Latt et al, 1981; NTP, 1984). La más grande ventaja de los estudios de ICH *in vivo* es que se puede observar como el agente de interés es metabolizado por el organismo huésped. Además, el examen en animales también permite la observación de tejidos a los que no se puede tener acceso en humanos, como son las células germinales y de los órganos. Estos estudios permiten la comparación de la sensibilidad de varios tejidos al agente mutagénico junto con la comparación entre los estudios en animales con los estudios en humanos, lo cual proporciona información acerca de las diferencias entre la respuesta específica del hombre a la exposición de dicho agente.

2. OTRAS ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS GENÉTICO

Se ha reportado ampliamente que el índice mitótico (IM) e índice de replicación (IR), conjuntamente con otros marcadores biológicos son de los más adecuados indicadores de la proliferación celular, sobre todo en estudios de genotoxicidad. Por su sensibilidad para determinar la acción citotóxica y citostática de diversos contaminantes ambientales y agentes terapéuticos (López M. M. et al, 2008).

2.1 Índice de replicación

El índice de replicación es un parámetro que permite diferenciar drogas que inducen muerte celular de aquellas que inducen un efecto citostático por detener el ciclo celular en alguna de sus fases. (López M. M. et al, 2008) La modificación del ciclo celular se manifiesta como un cambio en el porcentaje de células en las diferentes etapas de duplicación. Éste desorden se ha relacionado con el daño al ADN y se considera como una de las fases de los procesos carcinogénicos (Veronese S. M. et al, 1993, Meyer J. L, 1995).

La técnica para su identificación se basa en la tinción de ICH propuesta por Perry y Wolf en 1974 y es explicado por el modelo de Painter (1980, 1982) antes mencionado, cada generación corresponde a un ciclo de replicación de tal forma que en la el primer ciclo de replicación pueden verse cromosomas intensamente teñidos. En el segundo ciclo de replicación se observan los cromosomas arlequinados necesarios para el conteo de ICH y en tercer ciclo de replicación se pueden tener mezclas de ambos junto con cromosomas totalmente coloreados con un tono claro (Figura 1).

2.2 Índice mitótico

El índice mitótico mide la actividad proliferativa celular directamente en la sección histológica elegida. Se refiere específicamente al número de células expresado como una fracción del total y se acepta como una medida de toxicidad aceptable para los cultivos de linfocitos. (Galloway et al, 1994) También se ha asociado con los procesos cancerígenos, llegando a ser tan significativa su determinación como el número de metástasis o tamaño de un tumor (Donegan W. L, 1997).

Comúnmente se mide como número de mitosis por el número de campos que el investigador decida (comúnmente son 10 campos) en la tinción de rutina. No requiere tecnología especial pero varía con la selección de los campos. Se ha logrado correlacionar el aumento de IM con la disminución de sobrevivencia del cáncer (Donegan W. L, 1997; Anaise D, 2012).

2.3 Índice de proliferación celular

También llamado cinética de proliferación celular (CPC), el índice de proliferación celular es un indicador de los efectos citotóxicos del microambiente con el que está en contacto la célula. Se toma en cuenta el porcentaje de núcleos transformados contra el porcentaje de núcleos que no han respondido al mitógeno y por lo tanto no se han transformado, es decir necróticos.

En éste apartado además se tomaron en cuenta los núcleos apoptóticos tomando en cuenta los criterios de Fenech M. et al (2003):

- *Condensación de la cromatina en el núcleo (membranas intactas).*
- *Fragmentación nuclear, pequeños cuerpos de membrana intacta.*
- *Mayor intensidad de tinción.*

3. CÁNCER

La palabra cáncer proviene del término griego *karkinoma* y su equivalente latino *cáncer*, que se empleaban para denominar a los tumores que infiltraban los tejidos adyacentes adquiriendo una forma que recordaba a la del cuerpo de un cangrejo (González J. M. et al, 2001).

El cáncer no es solo una enfermedad multifactorial, además de que hay más de 100 diferentes tipos. Cada tipo toma el nombre del órgano o de las células en donde empieza, por ejemplo, el cáncer que empieza en el colon se llama cáncer de colon; el cáncer que empieza en las células basales de la piel se llama carcinoma de células basales (Instituto Nacional del Cáncer, 2011).

Las células cancerosas se diferencian de las células normales por presentar alteraciones en los procesos que controlan la proliferación y diferenciación celular debidas a cambios en las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican ciertas proteínas, de manera que el cáncer se considera una enfermedad genética (González J. M. et al, 2001).

Los tipos de cáncer se pueden agrupar en categorías más amplias. Las categorías principales de cáncer son:

- *Carcinoma: cáncer que empieza en la piel o en tejidos que revisten o cubren los órganos internos.*
- *Sarcoma: cáncer que empieza en hueso, en cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén.*
- *Leucemia: cáncer que empieza en el tejido en el que se forma la sangre, como la médula ósea, y causa que se produzcan grandes cantidades de células sanguíneas anormales y que entren en la sangre.*
- *Linfoma y mieloma: cánceres que empiezan en las células del sistema inmunitario.*
- *Cánceres del sistema nervioso central: cánceres que empiezan en los tejidos del cerebro y de la médula espinal (Instituto Nacional del Cáncer, 2011).*

Durante la carcinogénesis, se alteran seis propiedades celulares fundamentales para dar origen al fenotipo completo del cáncer más destructivo. Tumores menos peligrosos surgen cuando sólo se producen algunos de estos cambios (Boticario C. et al, 2008):

- *Angiogénesis sostenida*
- *Insensibilidad a las señales de anticrecimiento*
- *Evasión de la apoptosis*
- *Potencial replicativo ilimitado*
- *Invasión tisular y metástasis*

El cáncer suele ser el resultado de mutaciones que aparecen en el curso de la vida durante una exposición a los carcinógenos, que incluyen ciertas sustancias químicas y radiación ultravioleta, pero los procesos de formación de cáncer, denominados oncogénesis o tumorigénesis.

Para alcanzar cierto tamaño, los tumores deben obtener irrigación sanguínea y suelen lograrla mediante la señalización que induce el crecimiento de vasos sanguíneos o angiogénesis. A medida que el cáncer avanza, el tumor se convierte en un “órgano” anormal, cada vez mejor adaptado para el crecimiento y la invasión de los tejidos circundantes. Tanto los tumores primarios como los secundarios requieren angiogénesis para crecer hasta alcanzar una masa grande.

Las células cancerosas se pueden multiplicar en ausencia de al menos algunos de los factores estimuladores de crecimiento necesarios para la proliferación de las células normales y son resistentes a señales que normalmente programan la muerte celular (apoptosis).

3.1 Protooncogenes, Oncogenes y Genes supresores de tumores.

En el desarrollo tumoral se producen dos tipos de alteraciones genéticas. La activación de genes denominados protooncogenes celulares y la inactivación de genes supresores de tumor o antioncogenes (Weiss G. R, 1997).

Los protooncogenes se encuentran en todas las células del organismo y son imprescindibles para el crecimiento, proliferación y supervivencia de las células no tumorales. Cuando uno de los alelos de estos genes se altera, se convierte en un oncogen. Entonces se produce un incremento de la función de la proteína o la generación de proteínas mutadas con funciones diferentes (González J. M. et al, 2001). La expresión genética incrementada o la producción de un producto hiperactivo promueven el crecimiento descontrolado de las células afectadas. Un oncogén, por tanto, es cualquier gen que codifica una proteína capaz de transformar células en cultivo o inducir cáncer en los animales (Lodish H. et al, 2005).

La conversión o activación de un protooncogén a un oncogén por lo general involucra una mutación con ganancia de función. Al menos cuatro mecanismos pueden producir oncogenes de los correspondientes protooncogenes:

- *Mutaciones puntuales.*
- *Translocación cromosómica que fusiona dos genes juntos para producir un gen híbrido.*
- *Traslocación cromosómica que ubica un gen regulador del crecimiento bajo el control de un promotor diferente que causa la expresión inadecuada del gen.*
- *Amplificación es decir, la replicación anormal de un segmento de DNA que incluye un protooncogén.*

Como quiera que surjan, las mutaciones con ganancia de función que convierten protooncogenes en oncogenes son genéticamente dominantes, es decir, las mutaciones en sólo uno de los dos alelos son suficientes para la inducción del cáncer (Lodish H. et al, 2005).

Los genes supresores de tumores normalmente restringen el crecimiento, por lo que si se dañan se produce un crecimiento inapropiado. La pérdida de actividad de un gen supresor de tumor conduce a la formación de un tumor. (Weiss G. R, 1997) Muchos de los genes en ambas clases codifican proteínas que ayudan a regular el nacimiento celular por ejemplo, la entrada y la progresión a través del ciclo celular o la muerte celular mediante apoptosis, otros codifican proteínas que participan en la reparación del DNA dañado (Lodish H. et al, 2005).

Si bien las enzimas de reparación del DNA no inhiben directamente la proliferación celular, las células que perdieron la capacidad de reparar errores, o extremos quebrados del DNA acumulan mutaciones en muchos genes, incluidos los que son críticos para controlar el crecimiento y la proliferación celular. En consecuencia, las mutaciones con pérdida de función en los genes que codifican enzimas reparadoras del DNA evitan que las células corrijan mutaciones que inactivan genes supresores de tumores o activen oncogenes (Lodish H. et al, 2005).

3.2 Tipos de Carcinógenos

Aunque las sustancias identificadas como carcinógenos químicos tienen un espectro estructural muy amplio sin rasgos unificadores, pueden clasificarse en dos categorías generales:

Los carcinógenos de acción directa que al reaccionar químicamente con los átomos de nitrógeno y oxígeno en el DNA, estos componentes pueden modificar las bases en el DNA de manera tal de distorsionar el patrón normal del apareamiento de bases.

Por el contrario, los carcinógenos de acción indirecta son compuestos no reactivos insolubles en agua que pueden actuar como potentes inductores de cáncer sólo después de la introducción de centros electrófilos (Lodish H. et al, 2005).

3.3 Mecanismos de reparación

La importancia que tiene el mantener una copia “sana” del material genético para la célula, ha hecho que los seres vivos desarrollasen toda una serie de estrategias para reparar los daños que se producen de manera constante en el ADN. La célula hace uso de todos ellos para la supervisión y reparación de su genoma, y además en muchos casos, estos interactúan (Dámasco et al, 2011). Se pueden dividir en dos clases:

- *Reparación directa: aquellos en los que no intervienen nucleasas ni ADN-polimerasas.*
- *Reparación indirecta: aquellos en los que hay intervención de nucleasas y ADN-polimera-*

sas. Se necesita hebra “molde” perteneciente al mismo cromosoma o al homólogo:

- Escisión de base.
- Escisión de nucleótido.
- Recombinación de regiones homólogas/ Unión de fragmentos terminales de hebras rotas.

Cada uno de estos sistemas funciona en forma similar: se escinde un segmento de la hebra de DNA dañada y la brecha es rellenada por una DNA polimerasa y ligasa empleando la hebra de DNA complementaria como molde.

La pérdida de estos sistemas se correlaciona con un riesgo acrecentado de cáncer. Por ejemplo, las personas que heredaron mutaciones en los genes que codifican una proteína crucial de escisión-reparación o de reparación de aparcamientos incorrectos tienen una probabilidad mucho mayor de padecer ciertos cánceres (Lodish H. et al, 2005).

3.4 La Inmortalización de células cancerosas

Los telómeros, los extremos físicos de los cromosomas lineales, consisten en disposiciones en tándem de una secuencia corta de DNA, TTAGGG en los vertebrados. Proporcionan la solución al problema del final de la replicación: la incapacidad de las DNA polimerasas para replicar la totalidad del extremo de una molécula de DNA de doble hebra. La telomerasa, una transcriptasa inversa que contiene una hebra molde de RNA, añade repeticiones TTAGGG a los extremos de los cromosomas para alargar o mantener las regiones de 5 a 20 kb que decoran los extremos de los cromosomas humanos. Las células de la línea germinal y las células somáticas en rápida división, (por ejemplo las células madre) producen telomerasa, pero la mayoría de las células somáticas humanas carecen de ella. Como resultado, sus telómeros se acortan con cada ciclo celular. La pérdida completa de telómeros conduce a fusiones de cromosomas en un extremo y otro y a la muerte celular. El acortamiento extenso de telómeros se detecta como un tipo de daño del DNA, con la consecuente estabilización y activación de la proteína p53, lo que lleva a la apoptosis desencadenada por p53 (Lodish H. et al, 2005).

La inmortalización se refiere a la capacidad de las células cancerosas de crecer indefinidamente sin que haya necesariamente otros cambios en el fenotipo (Lewin B, 1994). Esto se debe a que la mayoría de las células tumorales, a pesar de su rápida velocidad de proliferación, supera este destino expresando telomerasa. Muchos investigadores creen que la expresión de telomerasa es esencial para que una célula tumoral se torne inmortal, y se sugirieron inhibidores específicos de telomerasa como agentes terapéuticos contra el cáncer (Lodish H. et al, 2005).

4. CÁNCER MAMARIO

4.1 Estructura anatómica de la glándula mamaria

Las glándulas mamarias están situadas en la región anterior del tórax, a ambos lados del esternón hasta la axila y desde la 2ª hasta la 6ª costilla, adosadas al músculo pectoral mayor. Tienen forma hemisférica, determinada por la propia glándula y la fascia que la rodea, que contienen abundante grasa. En su zona central está el pezón, un saliente cilíndrico de aproximadamente 1 cm de anchura y 1 cm de altura, perforado por 15 o 20 orificios denominados poros galactóforos. El pezón, está rodeado por la areola mamaria, cuya superficie es irregular por las abundantes glándulas sebáceas que contiene. El pezón y la areola tienen una coloración rosada hasta el primer embarazo a partir del cual adquiere un color más oscuro (SAS, 2011).

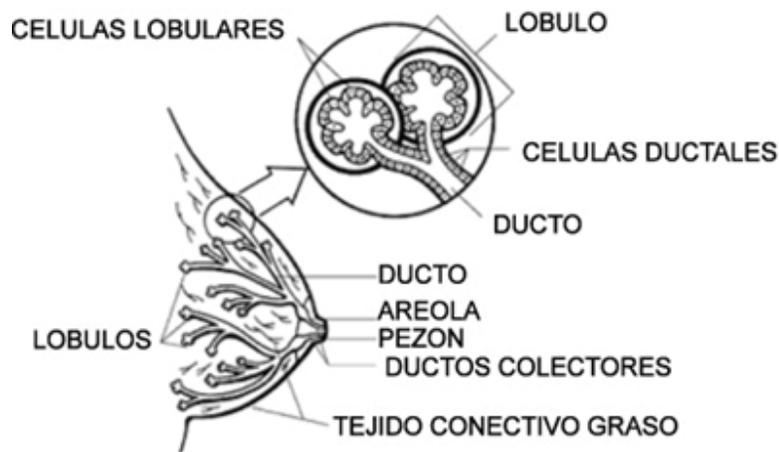


Figura 3. Anatomía general de la glándula mamaria. Fuente: PEMEX, 2008.

4.1.1 Estructura interna

La estructura de la mama varía según el periodo de la vida de la mujer, pero mantiene unas características básicas constantes. Se trata de una glándula tubuloalveolar formada por 15 o 20 lóbulos separados por un tejido conjuntivo. Dichos lóbulos se consideran la unidad funcional de la glándula (Damjanov I, 2000). Cada lóbulo se divide en lobulillos, de los cuales surgen conductos interlobulillares que acaban reuniéndose en un conducto galactóforo. Cada conducto galactóforo se dirige hacia el vértice del pezón para abrirse en un poro galactóforo. Antes de entrar en el pezón presentan un ensanchamiento, el seno galactóforo o seno lácteo (SAS, 2011).

La glándula mamaria comienza a desarrollarse a partir de la pubertad gracias al estímulo hormonal de la secreción ovárica (estrógenos y progesterona). Los estrógenos favorecen la proliferación de la porción excretora (canales interlobulillares, conductos galactóforos), mientras que la progesterona es responsable del desarrollo de la porción secretora (lobulillos y lóbulos). Además, crece el tejido adiposo, lo que determina un

aumento de volumen de los senos. Durante los ciclos menstruales se produce, antes de cada período, un ligero aumento de volumen que desaparece después de su finalización. Este aumento se debe a la vasodilatación y al edema provocados por los cambios hormonales, pero no se producen cambios estructurales. A partir de la menopausia la glándula tiende a atrofiarse y a volver al estado anterior a la pubertad (SAS, 2011; Damjanov I, 2000).

4.2 Epidemiología

A pesar de que México carece de un registro poblacional que permita establecer la verdadera incidencia de nuevos casos de cáncer, se sabe que el cáncer mamario es la primera causa de muerte por neoplasia en la mujer. En el mundo mueren más de 520000 mujeres cada año, 5 250 en México, lo que implica que, en nuestro país, una mujer fallece cada dos horas por esta neoplasia (CNCM, 2011; Universia México, 2012).

La Asociación Mexicana de Patólogos, la Dirección General de Epidemiología y el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), han colaborado para formar el Registro Histopatológico de las Neoplasias Malignas (RHNM). En dicho registro consta que en 2003 se presentaron 12 433 nuevos casos de cáncer mamario, 3 316 más que el año anterior, mayormente en edades de 40 a 59 y de más de 70 años (CNCM, 2011). Éste último dato concuerda con lo que ya antes se ha dicho, que el mayor riesgo de padecer cáncer mamario se manifiesta después de los 50 años y es máximo una vez cumplidos los 75. (Diaz E. et al, 2000). Cabe destacar que dicho registro no tiene base poblacional, sino que solo presenta la frecuencia relativa de tumores malignos con diagnóstico histológico de un centro hospitalario; sin embargo, ilustra el problema de cáncer en nuestro país a partir de los casos nuevos notificados anualmente (Mohar A. et al, 1997).

Actualmente, representa un importante problema de salud pública ya que a partir del 2006, el cáncer mamario es la segunda causa de muerte en el grupo de edad de 30 a 54 años, y se ubica como la primera causa de mortalidad por tumores malignos entre las mujeres. En países desarrollados es frecuente diagnosticar esta enfermedad en etapas tempranas, caso contrario ocurre en nuestro país, donde el diagnóstico se realiza en principalmente etapas avanzadas (SSA, 2002; CNCM, 2011).

De acuerdo con el CNCM (2011), el porcentaje promedio de diagnósticos, de acuerdo al estadio clínico es de 7.4% para estadios 0 y 1, 34.4% estadio II, 42.1% para estadio III y IV y 16.1% para enfermedades no clasificables. En países menos desarrollados, el menor porcentaje de casos diagnosticados corresponde a estadios tempranos (0 y I). En el año 2000 sólo se diagnosticaron entre 5 -10% de los casos en éstas etapas, contrario a lo que sucede en los países desarrollados, donde el 50% de los cánceres mamaros se diagnostican en esos estadios lo que ofrece mayores posibilidades de curación. En el otro extremo, del 40 a 50% de los casos diagnosticados corresponden a etapas muy avanzadas (estadio III) o diseminadas (IV). El costo del tratamiento del cáncer avanzado es más elevado y sus posibilidades de curación mucho más bajas. Además, el alto número de reportes “no clasificables”, señala poco control y seguimiento de los casos por la unidad

médica donde son diagnosticados; también incluye aquellos que han sido manejados de manera inadecuada antes de recibir terapéutica definitiva (SSA, 2002).

4.2.1 Mortalidad

La tasa de mortalidad para el año 2009 en mujeres de 40 a 49 años fue de 14.9 por 100 000; en las de 50 a 59 años de edad fue de 29.1; en las de 60 a 69 años fue de 37.0 y en las de más de 70 años de 53.1 por 100 000. Como se puede observar en la figura 4, para ese mismo año, la tasa de mortalidad de 17.0 por 100 000 mujeres de 25 y más años lo que representa un número de defunciones de 4 964, un incremento de 30% en los últimos 20 años (CNCM, 2011).

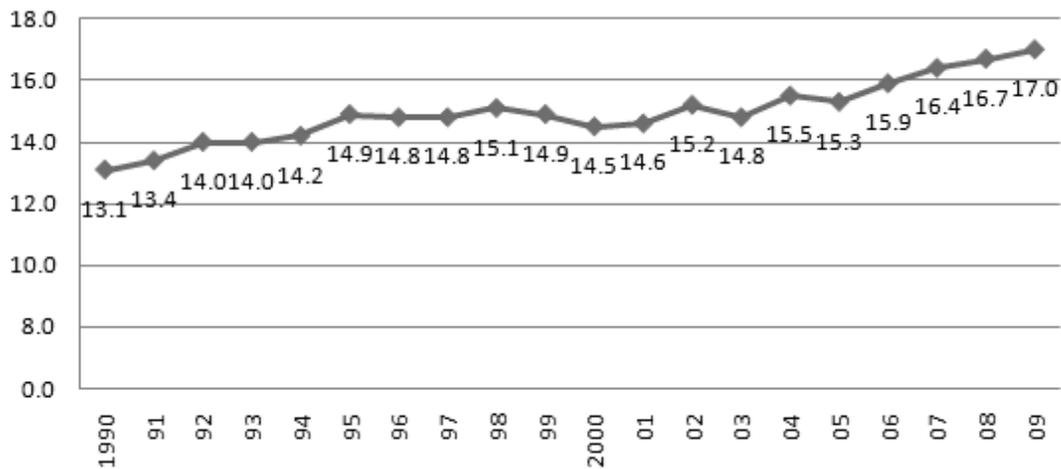


Figura 4. Tendencia de la tasa de mortalidad por cáncer de mama, 1990-2009. Fuente: CNCM, 2011.

El grupo de edad con mayor número de defunciones es el de 45 a 54 años, no obstante, debe destacarse que el grupo de 35 a 44 años presenta un número cercano al del grupo anterior, lo que demuestra una tendencia de las mujeres mexicanas a presentar cáncer mamario y a morir por esta causa, a una edad más temprana, con el consecuente impacto social que esto implica (SSA, 2002).

La mortalidad por área geográfica muestra que en los estados del norte hay una mayor tasa que en los estados del sur, como podemos ver en la figura 5:

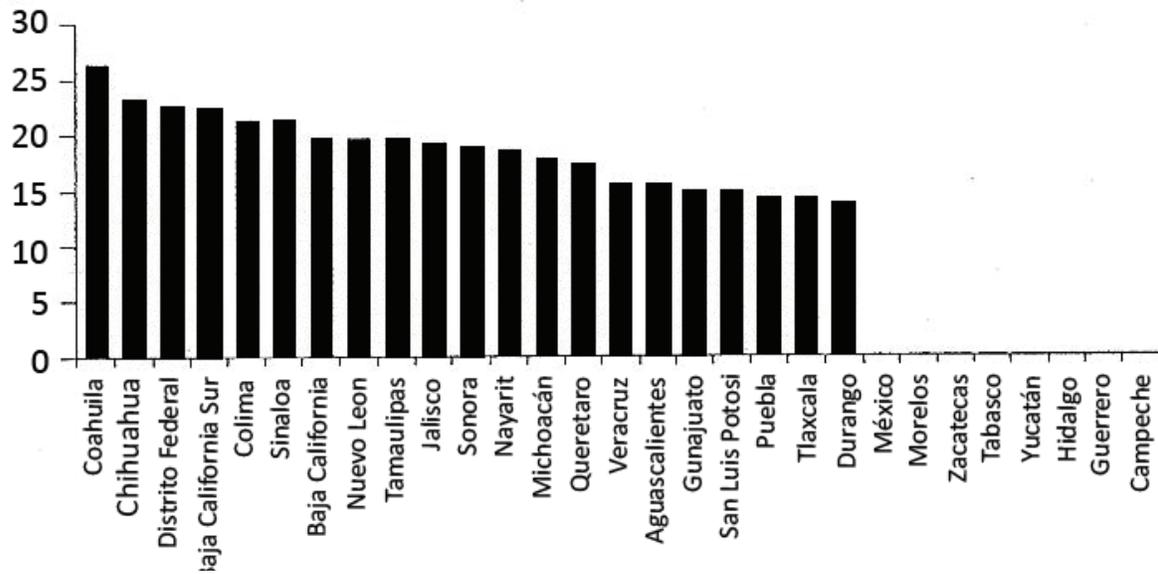


Figura 5: Mortalidad por cáncer de mama, según entidad federativa en el año 2009. Fuente: CNCM, 2011.

4.2.2 Morbilidad

En 1999, el grupo de edad que presentó la cifra más elevada fue el de 45 a 49 años, seguido por el de 40 a 44, como se muestra en la figura 6; sin embargo, llama la atención que desde los 35 años se aprecia un aumento significativo en el número de casos de esta neoplasia maligna y el 41.3% del total de los casos nuevos ocurrieron en mujeres menores de 50 años. Se detectaron además 37 casos de cáncer mamario en varones (SSA, 2002).

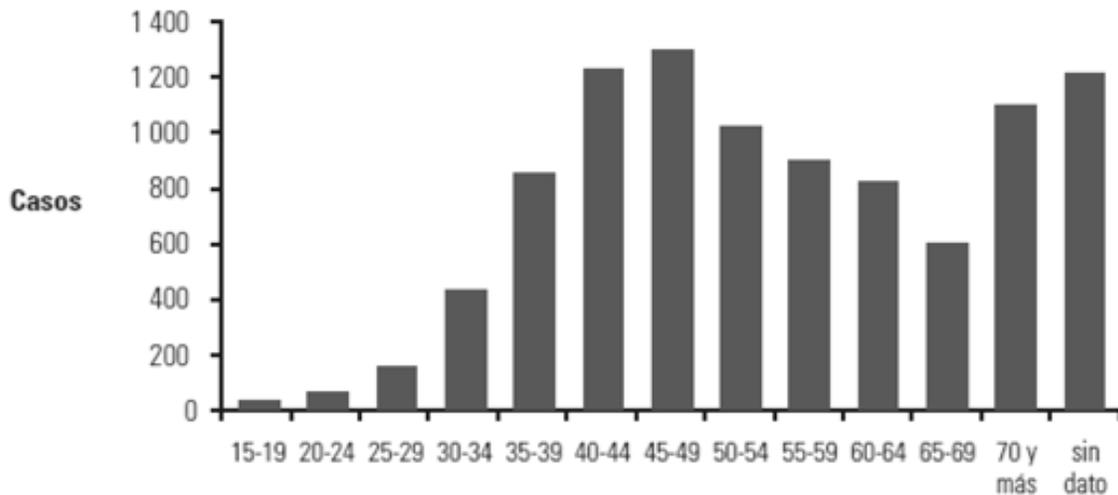


Figura 6. Número de casos de cáncer mamario por grupos de edad en el sector salud, 1999. Fuente: SSA, 2002.

Del total de las neoplasias diagnosticadas en el año 2000, se reporto que más de 500 casos no eran clasificables; la mayor incidencia reportada fue para etapa IIIB con más de 400 casos seguida por estadio IIIA y IV (figura 7) (SSA, 2002).

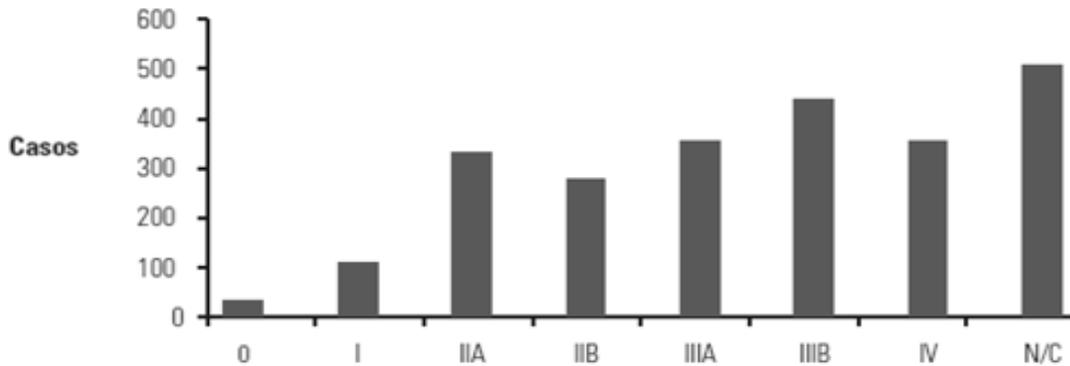


Figura 7. Casos de cáncer mamario según estadio al momento del diagnóstico en la SSA, 2000 (N/C: no clasificable) Fuente: SSA, 2002 .

4.3 Factores de riesgo

Pocos factores de riesgo afectan a más del 10 al 15% de la población, aunque algunos de ellos se relacionan con mayores riesgos relativos. También se debe conocer que, en la actualidad, entre el 70% y el 80% de todos los cánceres mamarios aparecen en mujeres sin factores de riesgo aplicables. Algunos de los más conocidos son sexo, edad, enfermedad mamaria benigna, aborto inducido, predisposición genética, uso de anticonceptivos orales antes o durante 1975, terapia de reemplazo hormonal, niveles de estrógeno endógenos, tamaño corporal y antropometría, antecedentes familiares, raza, periodos menstruales, alcohol, tabaquismo y exposición a radiación ionizante (Kirby J, 2004).

4.4 Clasificación

4.4.1 Clasificación general

Los tumores de mama se clasifican dependiendo de la estructura afectada así como su grado de invasividad en 4 tipos y uno extra que indica si la enfermedad es inflamatoria (Sanofi-Aventis, 2005):

- *Carcinoma ductal in situ:*

Se origina en las células de las paredes de los conductos mamarios. Es un cáncer muy localizado, que no se ha extendido a otras zonas ni ha producido metástasis. Por este motivo esta enfermedad 'pre maligna' puede extirparse fácilmente. La tasa de curación ronda el 100%. Este tipo de tumor se puede detectar a través de una mastografía.

- *Carcinoma ductal infiltrante o invasivo*

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

- *Carcinoma lobular in situ*

Se origina en las glándulas mamarias o lóbulos, suele presentarse antes de la menopausia. Ya que no es considerado un verdadero cáncer pero aumenta el riesgo de que la mujer pueda desarrollar un tumor en el futuro, una vez que es detectado, es importante que la mujer se realice una mamografía de control al año y varios exámenes clínicos para vigilar el posible desarrollo de cáncer.

- *Carcinoma lobular infiltrante o invasivo*

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

- *El carcinoma inflamatorio*

Es un cáncer poco común, tan sólo representa un 1% del total de los tumores cancerosos de la mama. Es agresivo y de rápido crecimiento. Hace enrojecer la piel del seno y aumentar su temperatura. La apariencia de la piel se vuelve gruesa y ahuecada, como la de una naranja, y pueden aparecer arrugas y protuberancias. Estos síntomas se deben al bloqueo que producen las células cancerosas sobre los vasos linfáticos.

También se existen varios factores clínicos (examen físico exhaustivo del tejido mamario, de la piel de la glándula mamaria y de los ganglios linfáticos regionales y en diversas modalidades de estudios por imágenes) y patológicos que permiten predecir el resultado a largo plazo en pacientes con cáncer mamario como son tamaño del tumor, situación de los ganglios linfáticos, tipo histológico, grado del tumor, índice mitótico y receptores hormonales, todo esto sumándolo al examen físico y de laboratorio. A continuación se enumeran algunos de los criterios más empleados para la estadificación de tumores mamarios (OMS, 1981):

Las Características del tumor primario

Tamaño del tumor. Se define como el tamaño máximo del componente invasivo del tumor primario.

Ubicación del tumor. Se ha demostrado que los pacientes con tumores mediales tienen peor pronóstico que los que tienen tumores laterales debido al mayor riesgo de recurrencia local.

Histología del tumor. La organización mundial de la salud clasificó los tumores en seis grupos principales, los más frecuentes son los epiteliales seguidos por el carcinoma inflamatorio.

Grado del tumor. Incorporan características citoplásmicas y nucleares como el tamaño, forma e hiper cromatismo, porcentaje y número de figuras mitóticas y túbulos, mas tarde se agregó al análisis la diferenciación de las células tumorales.

Características histopatológicas del tumor. La situación de los ganglios linfáticos es lo que más influye en el fracaso del tratamiento y en la supervivencia, características como la falta de limitación, invasión perineural, necrosis tumoral, ausencia de histiocitosis sinusal y otros parámetros se relaciona con una mala supervivencia. Otros parámetros con valor pronóstico son la invasión de los vasos sanguíneos, la extensión linfática, la elastosis, la tinción de glucógeno y la presencia o ausencia de respuestas inflamatorias numerosas en el huésped.

Receptores de estrógenos y progesterona. La presencia de receptores de estrógenos (RE) y receptores de progesterona (RP) por lo general se correlaciona con un mejor pronóstico y mejor respuesta a la quimioterapia.

Mapeo de ganglio centinela. El concepto de ganglio centinela se basa en la idea de que las células cancerosas se diseminan siguiendo un orden mediante una comunicación linfática directa a partir de un tumor primario hacia el ganglio centinela, por tanto, éste será el primer afectado. En promedio se pueden encontrar de 1 a 3 ganglios centinelas en una cuenca axilar y éstos son teñidos mediante diversas técnicas de inyección con sulfuro coloidal con tecnecio, azul isosulfano o la combinación de ambos agentes. Una vez teñidos, se extirpan y se realiza un examen histológico sistemático con cortes seriados y tinción de hematoxilina-eosina (H-E) para identificar depósitos del tumor en el ganglio linfático además de estudios inmunohistoquímicos.

4.4.2 Sistema TNM de estadificación

El sistema TNM de clasificación de tumores malignos fue concebido por primera vez por Denoix en 1943, se creó como un sistema que permitía clasificar a los pacientes en distintos grupos, cada uno con una tasa de supervivencia y pronósticos diferentes (Kirby, 2004).

El sistema actual requiere una confirmación microscópica y una tipificación histológica del tumor para la clasificación en estadios, además de un examen clínico completo para determinar el grado de afección neoplásica homolateral y contralateral de la piel, del tejido mamario, de los ganglios linfáticos regionales y alejados y de los músculos subyacentes. También se recomienda la realización de estudios de laboratorio sistemáticos, radiografías de tórax y mastografías bilaterales. Asimismo requiere la extirpación y el examen histológico de los ganglios axilares de nivel 1 por lo menos (6 o más ganglios) (Kirby J, 2004).

Estadio T (tamaño del tumor). El estadio clínico del tumor es el tamaño en centímetros con base en el examen físico y las diversas modalidades de imágenes (mastografía, ecografía, tomografía computarizada, resonancia magnética).

Estadio N. La estadificación clínica de los ganglios se basa en el examen físico o en los estudios de imágenes, que incluyen tomografía computarizada y ecografía, pero no centellografía linfática. Se trata del número de ganglios axilares afectados por la metástasis.

Estadio M. La enfermedad metastásica a distancia se designa como M.

Agrupación de estadios. En el nuevo sistema TNM existen cinco estadios 0, I, II, III, y IV. El estadio II se subdivide en A y B y el estadio III en A, B y C. en la figura 8 se ilustran las características de cada estadio.

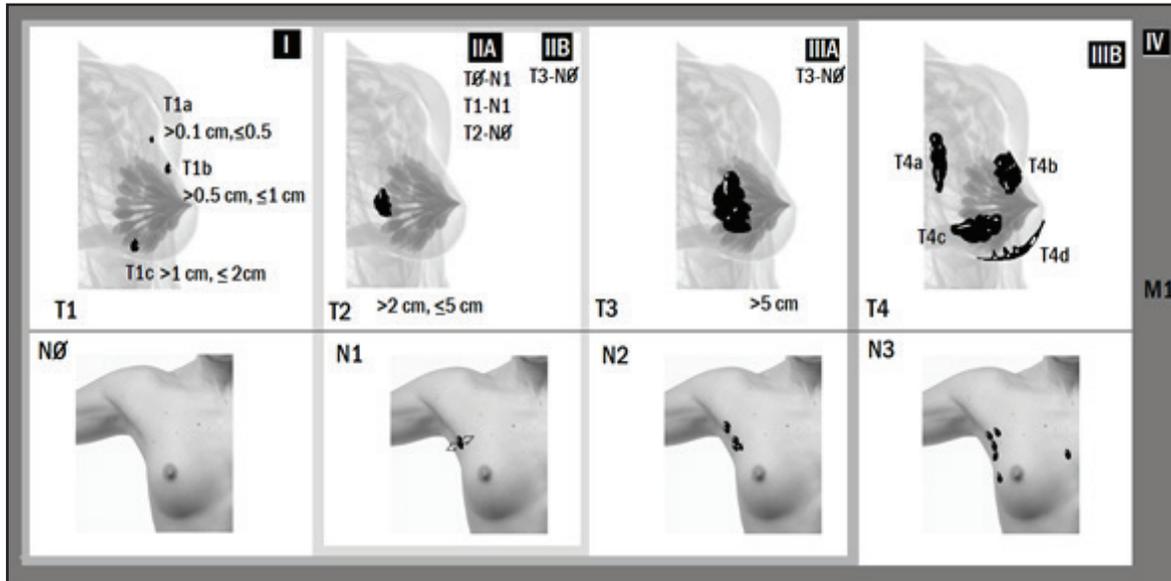


Figura 8. Estadificación anatómica del cáncer de mama.

(T4a: extensión a la pared torácica; T4b: edema o ulceración de la mama o de nódulo satélite cutáneos localizados en una mama; T4c: T4a y T4b; T4d: carcinoma inflamatorio).

Fuente: Prosnitz, 2003.

El estadio 0 se refiere a un cáncer preinvasor sin penetración, sin metástasis y con pronóstico del 100% de curación. En el estadio I hay presencia de tumores con micrometástasis, pequeños y de localización únicamente en la mama. Estadios IIA y IIB se caracterizan por metástasis a ganglios regionales, son de peor pronóstico. IIIA, IIIB y IIIC tienen tumores de mayor tamaño, localmente avanzados, con peor pronóstico. El estadio IV se refiere a diseminación sistémica a distancia de la enfermedad y de supervivencia baja.

5. TRATAMIENTO

El tratamiento del cáncer de la mama precisa la combinación de diversas disciplinas terapéuticas para conseguir un control eficaz de la enfermedad. Las modalidades terapéuticas contra el cáncer mamario son la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, la hormonoterapia e inmunoterapia. Las dos primeras actúan a nivel local, es decir sobre la enfermedad en la mama y los ganglios linfáticos y constituyen el tratamiento de elección en la enfermedad localizada no metastásica, la tercera actúa tanto a nivel local, como general, en lo que se denomina tratamiento sistémico, y se utilizan de forma complementaria al tratamiento local con cirugía y/o radioterapia o como tratamiento de primera elección en la enfermedad metastásica o diseminada (Kirby J, 2004; Khosravi P. et al, 2008; CNCM, 2011).

La cirugía de mama presenta diferentes técnicas. A pesar de que se ha demostrado que la cirugía conservadora (CC) seguida de radioterapia locorregional tiene una eficacia igual a la mastectomía radical modificada (CRM), existe actualmente la tendencia a practicar una cirugía tan conservadora como sea posible, siempre y cuando ésta se realice teniendo en cuenta las contraindicaciones para dicha cirugía (ver tabla I). La resección de una parte limitada de la mama que contiene el tumor se denomina tumorectomía o lumpectomía. Antes de que un tumor se logre palpar en una revisión clínica a veces es identificado en la mastografía (Khosravi P. et al, 2008).

Tabla I: Contraindicaciones de la cirugía conservadora. Fuente: Khosravi P. et, 2008; CNCM, 2011.

1. Tamaño del tumor mayor de 5cm (valorar neoadyuvancia).
2. Microcalcificaciones sospechosas extensas en la mamografía.
3. Colagenopatía activa con afectación dérmica (Lupus Eritematoso Sistémico, esclerodemia).
4. Desproporción entre tamaño del tumor/mama.
5. Radioterapia torácica previa.
6. Lactancia/embarazo (no se puede dar radioterapia).
7. Multicéntrico.
8. Enfermedad de Paget.
9. Mujeres mayores de 40 años.

La cirugía como primera elección se considera contraindicada en el tratamiento del cáncer mamario en la mayoría de casos de afectación de estructuras vecinas, incluida la piel (estadio T4 de la clasificación TNM), en la enfermedad metastática diseminada y en el carcinoma inflamatorio. En estos casos la cirugía se indica de forma secundaria como tratamiento de rescate de la enfermedad local después de otros tratamientos como la quimioterapia, la hormonoterapia y la radioterapia como terapéutica primaria de elección (Khosravi P. et al, 2008).

5.1 Radioterapia

La radioterapia adyuvante tras cirugía está indicada en las siguientes situaciones:

- *Tras cirugía conservadora de la mama*

La radioterapia del cáncer mamario siempre está indicada ante una cirugía conservadora de la mama pues disminuye la probabilidad de recaída local (Kirby J. et al, 2000; CNCM, 2011).

- *Tras mastectomía radical*

Se irradiará si existen más de 3 ganglios axilares infiltrados, si el tamaño tumoral es mayor de 5 cm o es T4, si sólo existen entre 1 y 3 adenopatías en la axila o si se cumplen dos de los tres factores de mal pronóstico como grado III histológico, menor de 40 años o premenopáusica y receptores hormonales negativos (Kirby J. et al, 2000).

- *Paliativa*

Está indicada ante metástasis que generalmente producen dolor, sobre todo las metástasis óseas y cerebrales (Kirby J. et al, 2000).

5.2 Quimioterapia

Las modalidades de aplicación de la quimioterapia en los pacientes con cáncer mamario pueden ser las siguientes:

- *Neoadyuvante*

El término neoadyuvancia se refiere al tratamiento sistémico inicial o primario que se administra antes de un tratamiento radical (cirugía o radioterapia) (CNCM, 2011). Está indicada en los cánceres de mama localmente avanzados, y en aquellos que midan más de 3 cm o que tengan adenopatías axilares. Se suele utilizar adriamicina y taxanos. La intención de la neoadyuvancia es principalmente la disminución del tamaño tumoral para practicar una cirugía conservadora y la valoración de la respuesta a la quimioterapia para posteriores tratamientos (Khosravi P. et al, 2008).

- *Adyuvante*

La quimioterapia adyuvante es la que se administra después de la cirugía. Su indicación depende de los factores pronóstico clásicos que son la edad, el tamaño tumoral, la afectación ganglionar axilar, el grado de diferenciación celular (grado histológico) y los receptores hormonales. Si los ganglios axilares son negativos de infiltración tumoral las pacientes se clasifican en bajo y medio-alto riesgo. Las de bajo riesgo (receptores hormonales positivos, tumores menores de 2 cm, grado I histológico y mayores de 35 años) no son susceptibles de quimioterapia adyuvante. Las de riesgo medio-alto (receptores hormonales negativos o positivos pero con grado II-III histológico y tumores mayores de 2 cm), se benefician de la quimioterapia adyuvante. Las pacientes con ganglios axilares positivos, siempre se benefician de la quimioterapia adyuvante, excepto en mujeres mayores (70-75 años) o que padezcan otras enfermedades que contraindique la quimioterapia (Khosravi P. et al, 2008).

▪ *Paliativa*

La quimioterapia ante una enfermedad diseminada o recaída está indicada de primera línea ante receptores hormonales negativos, enfermedad visceral, intervalo corto desde la cirugía o sintomatología relacionada con la recaída o la metástasis (Khosravi P. et al, 2008).

5.2.1 Fármacos quimioterapéuticos

Entre los regímenes más utilizados en el combate contra el cáncer mamario se encuentra el de Adriamicina – Ciclofosfamida (A/C).

Ciclofosfamida

Es un fármaco antineoplásico que también tiene propiedades inmunosupresoras. Pertenece a la familia de los fármacos alquilantes, dentro de la subdivisión de las mostazas nitrogenadas; entre los que se encuentran el busulfan, clorambucil y melfalan. Es el alquilante más potente que se ha sintetizado.

El fármaco, sin cambios tiene una vida media de 3 a 12 horas y se elimina como metabolitos principalmente. La concentración de metabolitos en plasma alcanza un máximo entre 2 y 3 horas después de una dosis intravenosa (Laboratorios Filaxix, Ciclofosfamida, 2002).

La ciclofosfamida es un profármaco, necesita ser activado por el sistema de enzimas microsomales hepáticas para ser citotóxico. El sistema de oxidasas de función mixta del citocromo P-450 microsomal hepático transforma la ciclofosfamida a 4-hidroxíciclofosfamida en equilibrio con aldofosfamida, estos metabolitos activos son transportados por el torrente sanguíneo al tumor y los tejidos normales, donde se presenta una fragmentación no enzimática de la aldofosfamida a las formas citotóxicas, mostaza de fosforamida y acroleína, dos potentes sustancias alquilantes del ADN (Katzung B, 1996; Laboratorios filaxix, Ciclofosfamida, 2002).

Al reaccionar con el ADN, los agentes alquilantes como la ciclofosfamida transfieren sus grupos alquilo a diversos constituyentes celulares, principalmente a la posición N7 de la guanina, la cual puede resultar en una mala codificación a través de bases anormales que se aparean con la timina o la despurinización mediante la escisión de los residuos de guanina. Este último efecto lleva a la ruptura de la cadena de ADN, mediante la escisión de la estructura de azúcar-fosfato del ADN. Además ataca también a la N1 y N3 de la adenina, N3 de la citosina y O6 de la guanina, así como los átomos de fosfato y proteínas relacionadas con el ADN (Katzung B, 1996).

Es un fuerte depresor de la médula ósea que es su principal efecto tóxico. Sus efectos adversos se presentan principalmente en las células de rápido desarrollo como vías gastrointestinales y gónadas. Suelen presentarse náuseas y vómito, originados por el

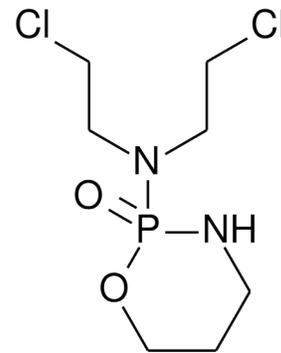


Tabla 9: Estructura molecular de la Ciclofosfamida.
Fuente: Imágenes google.

sistema nervioso central y que pueden reducirse con pretratamiento con fenotiacinas o cannabinoides. Su toxicidad más importante resulta en la supresión de la mielopoyesis relacionada con la dosis que ataca directamente la médula ósea. Destruye las células linfoides proliferativas, pero también puede alquilar algunas células en reposo, aun cuando no son específicos de ciclo celular, las células son más susceptibles en fases G1 tardía y S del ciclo celular y expresan bloqueo en G2 (Katzung B, 1996).

Adriamicina

Las antraciclinas, aisladas de *Streptomyces peuitus* var *caesius*, se han convertido en la piedra angular del tratamiento del cáncer mamario, la adriamicina, ha sido el medicamento más estudiado. También llamada doxorubicina, es un fármaco antibiótico que se encuentra entre los anticancerígenos citotóxicos más útiles (Katzung B, 1996; Arce C. et al, 2006).

Su mecanismo de acción se da por tres vías diferentes;

1. Fijación de alta afinidad al ADN a través de la intercalación con el bloqueo consecuente de la síntesis del ADN y el ARN y la escisión de la cadena de ADN a través de efectos de la topoisomerasa II.

2. Fijación a las membranas para alterar la fluidez y el transporte de iones

3. Generación del radical libre semiquinona y de oxígeno a través de procesos reductivos mediados por enzimas

Entre sus efectos adversos está la depresión de la médula ósea que es de corta duración con una rápida recuperación y una toxicidad cardiaca relacionada con la acumulación de la dosis, potencialmente reversible, dicho mecanismo parece ser causado por la producción intracelular de radicales libres dentro del miocardio por la doxorubicina. Una toxicidad secundaria es el signo casi universal de alopecia grave o total a dosis estándar.

La administración intravenosa de la adriamicina esta seguida por una rápida liberación plasmática ($t_{1/2}$ aproximada 10 minutos) y un enlace de tejido significativo. La vida terminal media es aproximadamente de 30 horas. Es parcialmente metabolizado, principalmente a doxorubicinol y en menor grado a aglicón, y es conjugado al glucoronido y al sulfato. La principal ruta de excreción es biliar y fecal.

Aproximadamente el 10% de la dosis se elimina por excreción renal. El volumen de distribución es de 800 a 3.500 L/m² (ALPHARMA, 1999; Laboratorios Filaxis, doxorubicina, 2002).

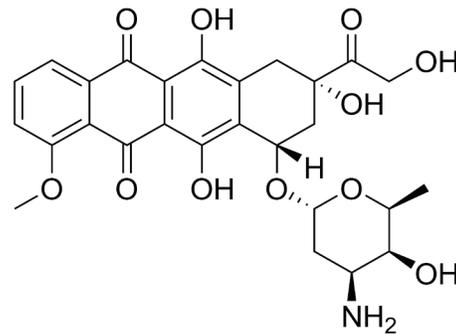


Tabla 9: Estructura molecular de la Ciclofosfamida. Fuente: Imágenes google.

5.3 Hormonoterapia

La hormonoterapia o terapia hormonal es una importante forma de tratamiento del cáncer mamario, debido a que las hormonas femeninas encontradas en la sangre pueden potenciar el crecimiento de la mayoría de las células tumorales del cáncer mamario. Existen diversos medicamentos hormonales utilizados frecuentemente en el cáncer mamario. Estos medicamentos impiden la unión de los estrógenos (hormonas femeninas) a las células tumorales. Por este motivo, reciben el nombre de fármacos anti-estrogénicos (Herruzo I, 2004; Farmacéutica Janssen, 2011).

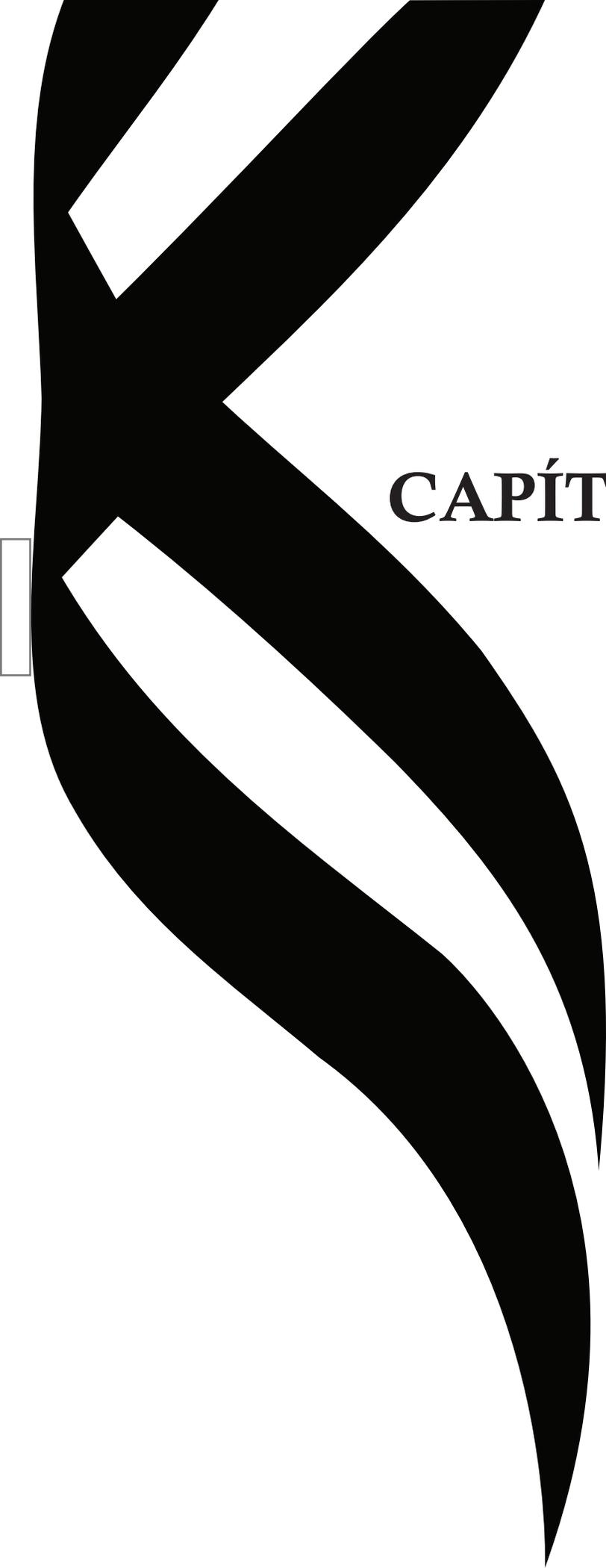
5.4 Inmunoterapia

Una forma común de la inmunoterapia utiliza partículas denominadas anticuerpos monoclonales, que se generan en laboratorio utilizando tejido animal, tejido humano o ambos. Estos anticuerpos con capacidad de destruir las células cancerígenas.

Los anticuerpos monoclonales actualmente empleados en la inmunoterapia contra el cáncer incluyen: bevacizumab (Avastin), ofatumumab (Arzerra), rituximab (Rituxan), cetuximab (Erbix), panitumumab (Vectibix) y trastuzumab (MD. Anderson Cancer Center, 2010; Yarden Y, 2001; Vogel C. L, 2002; Khosravi P. et al, 2008).

Una segunda y menos frecuente forma de la inmunoterapia es el uso de vacunas para provocar una respuesta inmunitaria de una forma muy similar a su uso contra enfermedades infecciosas partes de las células cancerosas se inyectan en el organismo, que reconocerá el material como extraño y lo eliminará, conjuntamente con otras células cancerosas del mismo tipo.

Las vacunas contra el cáncer se encuentran en estudio para luchar contra muchos tipos de cáncer, incluido el cáncer mamario. No obstante, hasta ahora, todas las vacunas contra el cáncer se encuentran disponibles únicamente por medio de ensayos (MD. Anderson Cancer Center, 2010).



CAPÍTULO 2

1. ANTECEDENTES

Los ICH se han empleado durante mucho tiempo como biomarcador de daño al ADN, ya sea por enfermedades tanto heredadas como contraídas o como marcador del efecto de la exposición a agentes xenotóxicos, ambientales, ocupacionales, medicamentosos, etc. Ejemplo de ello son los estudios que han demostrado que aspectos como la vacunación y medicación también pueden causar ICH. Los estudios de Crossen P. E. et al (1982) indican que la vacunación contra viruela y sarampión incrementa los niveles en días o semanas. Además se ha observado que terapias con ácido naladixico y Melfalan dan como resultado niveles elevados de ICH.

Hablando de agentes naturales, se evaluó el extracto acuoso de *Aloysia citriodora* Palau-verbenaceae "Cedrón", ampliamente utilizado en medicina folclórica, mediante ensayo de micronúcleos, ensayo del cometa, índice mitótico, Cinética de proliferación celular e Intercambio de Cromátides Hermanas en linfocitos humanos de sangre periférica expuestos a concentraciones de 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ infusión y liofilizado de infusión. Se observó que no hay diferencias estadísticamente significativas respecto de los valores control, indicando que no inducen efecto cito-genotóxico ni daño a la doble hélice del ADN en las condiciones empleadas lo que demuestra que dichas infusiones pueden ser usadas sin problemas médicos (López M. et al. 2009).

Un estudio de los efectos agudos y a largo plazo de las terapias con medicamentos y radiación en cáncer infantil incluye ICH y aberraciones cromosómicas. Los pacientes pretratados, pacientes bajo tratamiento, pacientes después de su terapia y pacientes adultos sanos como controles sumaron un total de 53 individuos. Se analizaron 50 células por persona. Dentro de los pacientes antes y después de tratamiento, los niveles de ICH fueron comparables con los de los controles mientras que en el caso de los pacientes que estaban bajo tratamiento las ICH incrementaron comparados con los de los controles tanto sanos como antes del tratamiento. Los datos con respecto a las rupturas cromosómicas siguieron en general, el mismo patrón que en el caso de los ICH. Se dedujo que la variabilidad dentro de los individuos podía ser debida a la amplia gama de tumores que se incluyeron en el estudio (Aronson et al, 1982).

Tirado et al (2005) uso éste estudio junto con el índice de proliferación y división nuclear, y el análisis de micronúcleos para detectar el daño genotóxico en niños expuestos a metales pesados. Comparando éstas muestras contra individuos sanos, encontraron que estos parámetros y la aparición de alta frecuencia de intercambios, más de 10 ICH en una célula, pueden ser usados como biomarcadores de efectos tempranos de exposición a carcinógenos.

También se ha investigado la permanencia de los ICH en los individuos después de haber interrumpido su exposición al agente tóxico, Haglund U. (1980) estudió ICH en niños después de haber concluido su tratamiento contra el linfoma maligno, tomo muestras de 4 meses a 13 años después del término del tratamiento y dedujo que dicho incremento regresa a la normalidad muy pronto pero también se ha encontrado que después de una serie de terapias con Ciclofosfamida, Adriamicina y 5-florouracilo, to-

dos fármacos quimioterapéuticos, de hasta 9 ciclos, la persistencia de los ICH puede ser de hasta 9 meses después del término de la terapia es decir, que el efecto de quimioterapéuticos es bioacumulativo y persistente (Tuker J. D. et al, 1990).

Con el objetivo de encontrar hasta qué punto la genotoxicidad está relacionada con el potencial de carcinogénesis y observar las características de la habilidad de inducir ICH de las sustancias en el hombre, *in vivo*, Raposa (1987) realizó un estudio de la capacidad de producir aberraciones cromosómicas, micronúcleos e ICH de varios agentes citotáticos y de su potencial de inducir leucemia de las mismas sustancias. Para ello tomó muestra de sangre periférica de 68 donadores sanos y 59 pacientes con cáncer, principalmente leucemia, a diferentes intervalos: 1-7 días durante la terapia y 2-8 semanas después del fin de la terapia. Junto con lo anterior realizó una búsqueda bibliográfica de casos en los que hubiera la aparición de leucemia aguda secundaria al tratamiento. Encontró que los agentes alquilantes como la Ciclofosfamida y Melfalan, inducen elevación de ICH duradera (3-5 semanas después del término) y que el 84.9% de los citostáticos inducen ICH de lenta reparación, mientras que los llamados “venenos del huso” y fármacos que inhiben la síntesis de la purina o pirimidina no inducen ICH. Además de observar que las lesiones productoras de ICH más relevantes para la tumorigénesis son las que persisten con poca evidencia de reparación y por lo tanto, son de relevancia para aparición de leucemia aguda posterior al tratamiento.

Banerjee et al (1979) analizaron algunos fármacos quimioterapéuticos de las familias de los agentes alquilantes, los antibióticos antitumorales y productos naturales y los antimetabolitos por su habilidad de producir ICH. Aquellos que habían producido transformación oncogénica y rupturas cromosómicas fueron identificados como aquellos que producen ICH. En todos los casos, pero en los agentes alquilantes en especial, las concentraciones a las que produjeron el aumento de intercambios fueron considerablemente menores que a los que originaron transformación oncogénica o ruptura cromosómica, concluyendo con ello que el análisis de ICH es un método muy sensible para detectar el potencial mutagénico u oncogénico de diversos agentes.

Por último, pero no menos importante, podemos encontrar estudios que buscan la predicción de la probabilidad de sobrevivencia del cáncer y su tratamiento con la vista puesta a la individualización de los tratamientos. Un ejemplo de ellos es el trabajo hecho por Hatzis et al (2011), quien reunió pacientes recientemente diagnosticados con cáncer mamario, HER2/neu negativos, con quimioterapia a base de una antraciclina y taxanos. Lograron desarrollar formas distintivas de resistencia y respuesta a la quimioterapia neoadyuvante a partir de microarreglos. Además la sensibilidad al tratamiento se predijo usando la combinación de indicadores de terapia endocrina, quimioresistencia y quimiosensibilidad con lo que identificaron pacientes con alta probabilidad de sobrevivencia después del tratamiento.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los tratamientos más utilizados en las primeras fases de cáncer mamario es el esquema conocido como A/C. Estos fármacos tienen una gran cantidad de efectos adversos y eventualmente la paciente no tiene la respuesta esperada.

Además, el cáncer mamario tiene pronóstico y tratamiento distinto dependiendo del estadio, en cualquier caso, la respuesta es incierta y se evalúa solo al término de varios ciclos de terapia ya que actualmente no se emplean biomarcadores tempranos que den indicio sobre la respuesta al tratamiento antes de que éste concluya.

También debemos tomar en cuenta que cada individuo es diferente a otro, por lo que cada uno responderá de distinta manera, lo que nos lleva a que no existen tratamientos específicos ni personalizados dependiendo de la carga génica de cada paciente, lo que dificulta el trabajo del oncólogo al tener que calcular con base a su experiencia el mejor tratamiento para su paciente.

3. JUSTIFICACIÓN

Tomando en cuenta la gran cantidad de efectos adversos de la quimioterapia al paciente, esta investigación pretende conocer si la frecuencia de ICH, biomarcador de efecto o daño, puede ser empleada como un indicador que de manera temprana de indicio sobre la respuesta al tratamiento y apoyar el desarrollo y establecimiento de terapias individualizadas que al mismo tiempo reduzcan aún más el tiempo que tanto las pacientes como los hospitales luchan contra dichos efectos.

4. HIPÓTESIS

Se encontrará un aumento en la frecuencia de ICH así como una disminución en el IR en linfocitos de la muestra tomada después del tratamiento de A/C comparados con los de la muestra basal de cada paciente con cáncer mamario.

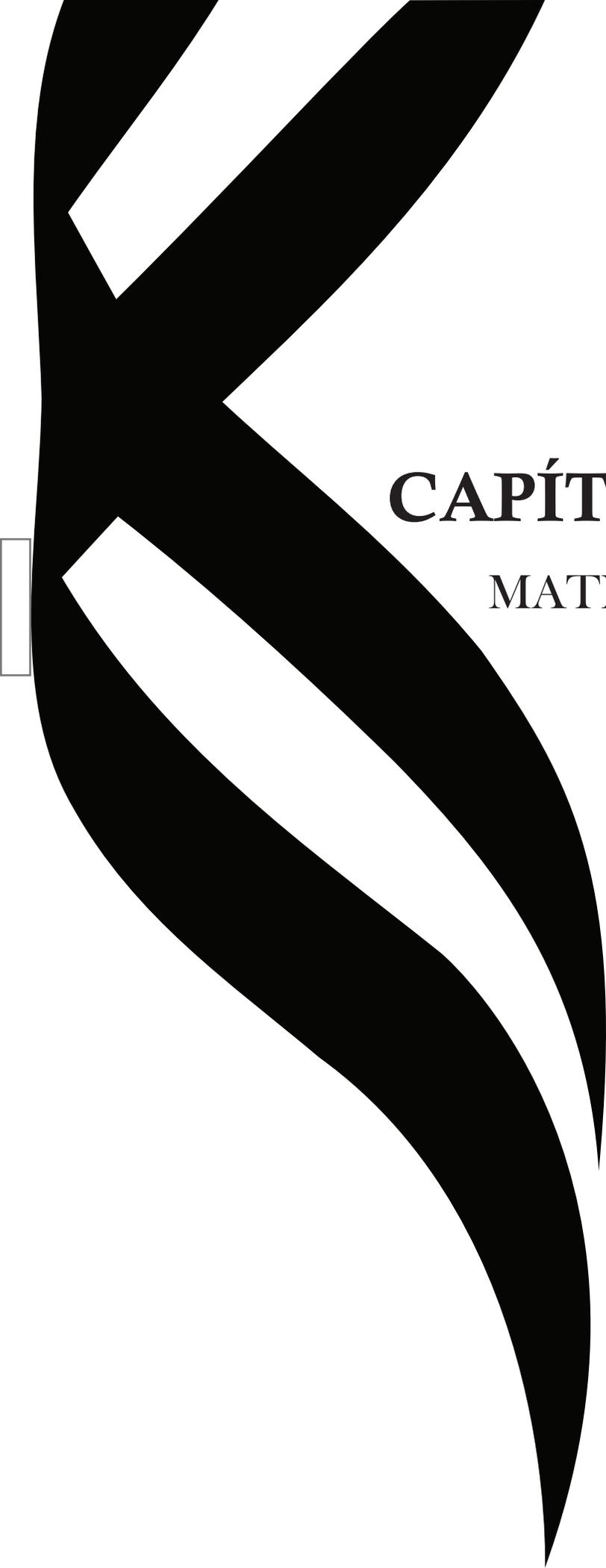
5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la frecuencia de ICH y el IR pueden ser indicadores tempranos de la respuesta al tratamiento en el cáncer mamario.

5.1 Objetivos Específicos

o Determinar si la frecuencia de ICH aumenta después del tratamiento y en qué medida.

o Determinar si IR e IM disminuyen significativamente después del tratamiento.



CAPÍTULO 3

MATERIAL Y MÉTODO

1. MATERIAL Y MÉTODO

1.1 Población en estudio

Se tomaron muestras de sangre periférica de mujeres con cáncer mamario, habitantes del Estado de México, pacientes del servicio de quimioterapia ambulatoria del Centro Oncológico Estatal del ISSEMyM.

A las pacientes captadas durante su primera consulta en la Unidad Funcional de Cáncer mamario, que cumplieron con los criterios de inclusión, se les invitó a participar en el proyecto. A las que aceptaron, se les explicaron los objetivos y alcances del estudio, así como el procedimiento de toma de muestras y se les pidió que firmaran una Carta de Consentimiento Informado (ver anexos) y se procedió con la toma de muestras.

La participación de cada individuo fué voluntaria, debían aceptar la toma de dos muestras, una antes de comenzar su terapia, la cual corresponde a la frecuencia basal, y la segunda al terminar su primer tratamiento, ese mismo día.

1.2 Criterios de selección

Inclusión

Pacientes con cáncer mamario, vírgenes al tratamiento y cuya terapia a recibir corresponde a un esquema A/C (Adriamicina / Ciclofosfamida).

Exclusión

Mujeres con cáncer mamario con tratamiento previo o con un esquema de quimioterapia diferente a A/C.

Eliminación

Rechazo de la paciente a la toma de la segunda muestra, hemólisis de cualquiera de las dos muestras, contaminación del cultivo, muestra insuficiente, resultados confusos, falta de material suficiente para realizar el estudio.

1.3 Técnica

Método de Intercambio de Cromátides Hermanas (Perry y Wolff, 1974)

1.3.1 Toma de muestra

Se tomarán 3 mL de sangre venosa para la primera muestra, durante la canalización de la paciente y, para la segunda toma, 7 mL por punción venosa en el brazo contrario a la canalización, ambas se tomaran en tubo Vacutainer verde (heparinizado) y se conservarán a temperatura ambiente hasta el momento de su proceso, el cual debe llevarse a cabo lo más pronto posible.

1.3.2 Siembra

En un frasco estéril y en condiciones de esterilidad, se agregan 5 mL de medio RPMI-1640, 0.25 mL de Fitohemaglutinina (Sigma), 3 gotas de antibiótico penicilina-estreptomicina (Microlab) con jeringa sin aguja, y 12-18 gotas de sangre total. Se agita suavemente, se tapa e incuba por 24 hrs a 37°C en ambiente de CO₂. Pasadas las 24 hrs se agregan 0.25 mL de Bromodioxiuridina (10 µg/mL de cultivo) y se deja incubar hasta cumplir 96 hrs.

1.3.2 Cosecha

Se sacan los frascos de cultivo, se destapan y adicionan 4 gotas de colchicina (Sigma, concentración 10 µg/mL) con jeringa sin aguja. Se tapan los frascos de cultivo, se mezcla gentilmente y se meten de nuevo a la incubadora por 3 horas y media.

Se trasvasa el contenido a un tubo cónico de 15 mL, se centrifuga a 1000 rpm durante 10 minutos. Se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur, teniendo cuidado de no tocar la pastilla del fondo. Se mezcla en el vórtex y se adiciona lentamente a cada tubo 6 mL de solución hipotónica de KCl (0.075M) puesta previamente a 37°C, se mezcla con su respectiva pipeta y se incuba por 20 minutos a 37°C.

Se centrifuga nuevamente 10 minutos a 1000 rpm y se retira el sobrenadante, se mezcla en el vórtex y se adicionan lentamente aproximadamente 5 mL de fijador Carnoy frío (metanol: ácido acético glacial 3:1). Se homogeneiza perfectamente y se pone en refrigeración por 30 minutos.

Se continua lavando haciendo cambios de fijador hasta obtener un sobrenadante claro y un botón celular blanco.

1.3.3 Preparación de laminillas

Los portaobjetos deben ser lavados y desengrasados perfectamente. Se meten en agua helada.

El botón celular se resuspende en aproximadamente 0.5 mL de fijador, se toman 3-4 gotas de suspensión y se dejan caer en el centro de la laminilla a 30-40 centímetros de altura procurando observar un espejo de agua en la laminilla, se sopla ligeramente para expandir el material y se flamea inmediatamente. Guardar protegidas de la luz y polvo.

1.3.4 Tinción diferencial

En oscuridad, se colocan 6 gotas de la solución de Hoechst 33258 (0.1 g/L) sobre la laminilla a teñir y se pone un cubreobjetos.

A los diez minutos se coloca la solución 1:1 buffer de diferenciación:agua por capilaridad para hidratar, no dejar secar. Exponer a la lámpara de UV por 50 minutos.

Preparar por separado la solución 2XSCC (NaCl 17.5 g/L, Citrato trisódico 8.8 g/L) y calentarla a 60°C en una copa Coplin de plástico y agua destilada en otra copa, también a 60°C.

A los 60 minutos se retira de la luz UV, se enjuaga a chorro de agua procurando que el cubreobjetos caiga por efecto del agua, se coloca en la solución 2XSCC por 15 minutos a 60 °C.

Se sumerge en agua a 60 °C como enjuague y después se vuelve a enjuagar al chorro de agua.

Se dejan secar a temperatura ambiente se tiñe con Giemsa al 10% hasta alcanzar una tinción diferencial en cada cromosoma, aproximadamente 30 minutos.

1.3.5 Medición de índices

Todas las mediciones se realizaron en forma de doble ciego, con laminillas codificadas de tal forma que no se supiera a q grupo pertenecían hasta una vez terminada la medición.

1.3.5.1 Índice de ICH

Se revisaron 30 metafases en segundo ciclo de replicación. Dichas metafases debían estar completas, es decir que tuvieran los 46 cromosomas propios de la metafase. Se contabilizaron los ICH terminales como un evento y los intermedios como dos. Un ejemplo se muestra en la figura 11.

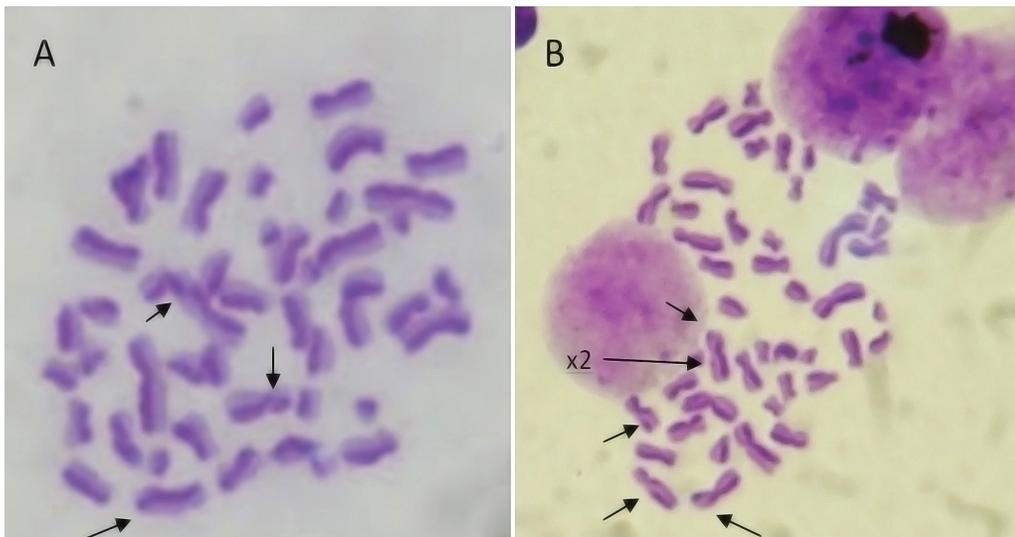


Figura 11: Metafases en segundo ciclo de replicación, se pueden observar los ICH: tres en la imagen A, y 6 en la figura B. Los intercambios intersticiales se cuentan como dos eventos.

1.3.5.2 Índice de replicación

Se registraron 100 metafases consecutivas haciendo distinción en la cantidad de ellas que estaba en cada ciclo de replicación. Para primer ciclo se tomaron en cuenta metafases con sus 46 cromosomas uniformemente teñidos con color oscuro (Figura 12-A). Para el segundo ciclo metafases con cromosomas arlequinados (Figura 12-B). Y para el tercer ciclo cualquier combinación de los anteriores con cromosomas uniformemente teñidos en color claro (Figura 12-C).

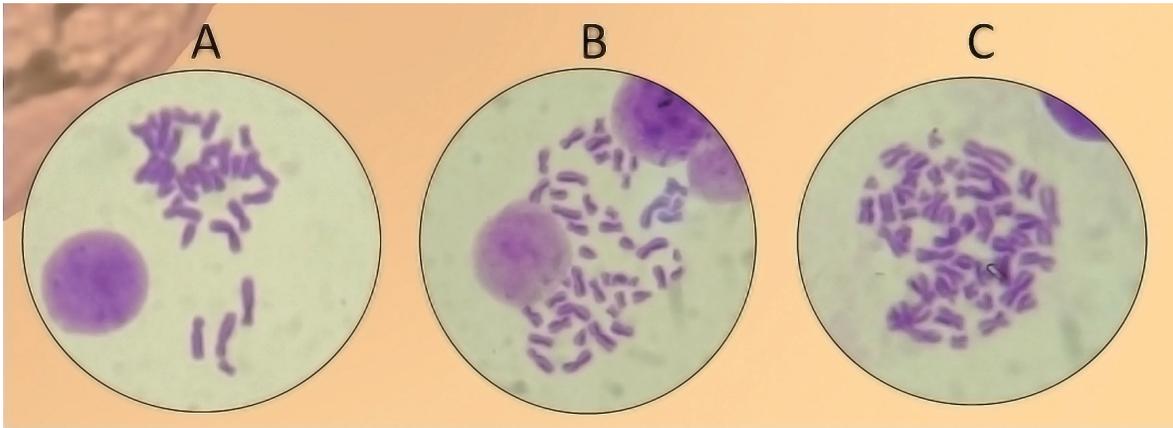


Figura 12: A: Metafase en primer ciclo de replicación. B: Metafase en segundo ciclo de replicación. C: Metafase en tercer ciclo de replicación.

Se trataron los datos obtenidos usando la fórmula propuesta por Krishna et al (1985):

$$IR = \frac{1M_1 + 2M_2 + 3M_3}{100}$$

Donde M_1 , M_2 y M_3 representan los porcentajes de metafases en primero, segundo y tercer ciclo de replicación.

1.3.5.3 Índice mitótico

Se contabilizó el número de metafases encontradas junto con 2000 células sucesivas y se evaluó con la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{\text{Número de metafases} \times 100}{2000 \text{ núcleos transformadas}}$$

1.3.5.4 Índice de proliferación celular

Se contabilizaron 2000 núcleos haciendo la distinción entre núcleos transformados y núcleos necróticos junto con los núcleos apoptóticos, como se muestra en la figura 13:

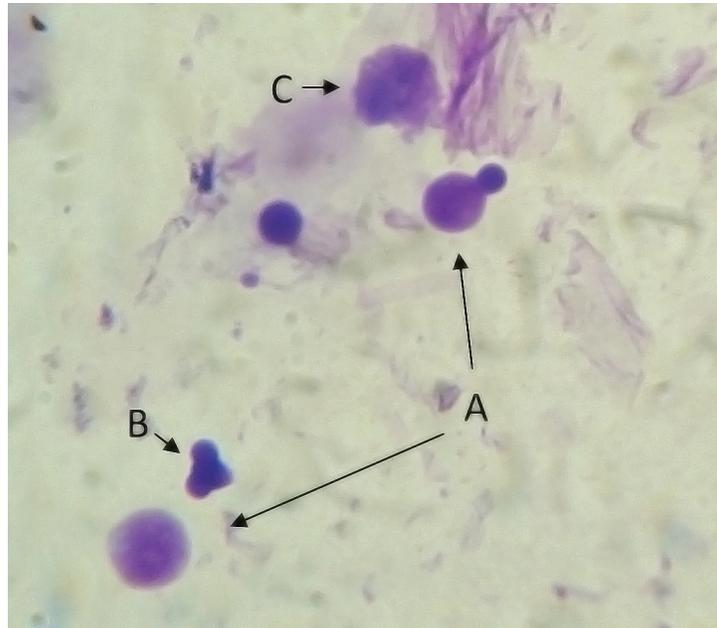


Figura 13: A: Núcleos transformados. B: Núcleos necróticos. C: Núcleos apoptóticos.

Los datos obtenidos se trataron con la siguiente fórmula:

$$IPC = \frac{\text{Número de núcleos transformadas} \times 100}{\text{Núcleos contabilizados}}$$

1.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa Sigma Plot para Windows versión 11.0, Systat software, Inc.

Para el análisis de ICH, IR, IM e IPC se realizó primero una prueba de la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk, en caso de que los datos estuvieran dentro una distribución normal se realizó una prueba de t pareada, en caso contrario, una prueba de Wilcoxon.

Finalmente, con la intención de analizar el nivel de correlación entre los receptores hormonales y en índice de ICH, se realizó ya sea la prueba de t de student o la U de Mann-Whitney dependiendo también de si la distribución de los datos era normal, con ello se comparó la cantidad de intercambios entre aquellos con la presencia o ausencia de RE, RP o del gen HER 2-neu.



CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron muestras de 17 pacientes del Centro Oncológico Estatal del ISSEMyM, las pacientes tuvieron una edad promedio de 47 años en un rango de 37 a 61 años, con enfermedad en estadios IIA (23.52%), IIIA (17.64%), IIB (29.41%), IIIB (17.64%) y dos casos no etapificables (11.76%).

Como se muestra en la tabla II, el 11.76% de los casos presentaron un carcinoma lobulillar infiltrante mientras que el 88.23% restante tenían un carcinoma ductal infiltrante. Nueve casos se presentaron en la mama derecha y ocho en la mama izquierda. El 35.29% de los casos fueron tratados bajo el esquema adyuvante, de los cuales tres de ellos fueron sometidos a una mastectomía radical modificada (MRM) y una más a una cirugía conservadora de mama, más tarde se le reoperó con MRM; el restante 64.70% bajo el esquema neoadyuvante.

En cuanto a los receptores hormonales, otro factor pronóstico de respuesta al tratamiento, el 41.17% de los casos fue negativo para Receptores de Estrógenos, 52.94% negativos para Receptores de Progesterona y 82.35% negativos para la presencia del gen HER-2 neu. El 100% de los casos tuvo una respuesta clínica favorable al momento del corte, reduciendo el tamaño o consistencia del tumor.

Tabla II. Resultados de los datos de diagnóstico de las pacientes y su evolución clínica.

CASO	EDAD	TIPO	LADO	ESTADIO	ESQUEMA	RE	RP	HER 2 NEU	CICLOS TRANS-CURRIDOS	RESPUESTA CLINICA
1	40	Ductal	Izq	IIB	ADY	-	-	-	8	✓
2	44	Ductal	Der	T2N1 IIB	ADY	-	-	-	8	✓
3	57	Ductal	Der	T2N0M0 IIA	ADY	-	-	+	8	✓
4	43	Ductal	Izq	T3N0M0 IIB	NADY	-	-	-	8	✓
5	45	Ductal	Izq	T2N1M0 IIB	NADY	95%	90%	+	7	✓
6	37	Lobulillar	Der	T3N0 IIB	NADY	+	+	-	7	✓
7	43	Ductal	Izq	T4N1M0 IIIB	NADY	+	+	-	5	✓
8	47	Ductal	Izq	T2N1M0 IIIA	ADY	5%	5%	-	5	✓
9	42	Ductal	Izq	no etapificable	ADY	+	-	-	5	✓
10	56	Lobulillar	Izq	T4N0M0 IIIB	NADY	+	+	-	5	✓
11	53	Ductal	Der	T2N0M0 IIA	NADY	+	60%	-	5	parcial
12	52	Lobulillar	Der	T3N1M0 IIIA	NADY	+	-	-	5	✓
13	40	Ductal	Der	no etapificable	NADY	90%	90%	-	5	✓
14	51	Ductal	Der	T4N2Mx IIIB	NADY	-	-	+	4	✓
15	36	Ductal	Der	T2N1M0 IIA	NADY	-	-	-	4	✓
16	61	Ductal	Der	T1N1Mx IIA	ADY	-	-	-	3	✓
17	45	Ductal	Izq	T2N2 IIIA	NADY	+	40%	-	3	✓

ADY = Esquema Adyuvante NADY = Esquema Neoadyuvante ✓ = Respuesta clínica favorable

De las 17 pacientes se obtuvo la frecuencia de ICH, IR, IM e IPC. Los resultados se muestran en la tabla III. Para ICH se tuvieron valores desde 0.37 a 1.23 antes de la terapia contra valores desde 0.57 a 3.40 después de la terapia, registrando un aumento en la frecuencia de ICH. Para el resto de los marcadores se registró una disminución de los valores de antes contra los de después: para IR antes de la terapia fueron de 1.16 a 1.61 contra 0.15 a 1.44 después de la terapia; en el caso de IM fueron de 0.19% a 16.60% antes de la terapia y 0.05% a 16.20% después de la terapia; y finalmente para IPC los valores fueron de 30.35% a 99.95% antes de la quimioterapia (QT) y de 4.45% a 89.23% después de la QT.

Tabla III. Resultados de la frecuencia de ICH, IR, IM e IPC de las pacientes les estudio.

Caso	ICH (x/cel)		IR (%)		IM (%)		IPC (%)	
	antes	después	antes	después	antes	después	antes	después
1	1.23	3.00	1.31	1.19	1.30	1.20	99.95	89.23
2	0.70	3.40	1.16	1.03	16.60	16.20	99.85	84.87
3	0.60	1.00	1.51	0.29	1.00	0.10	58.00	29.24
4	0.93	2.38	1.40	1.18	1.56	0.38	55.20	29.70
5	0.43	2.93	1.46	1.24	2.10	0.40	70.85	28.40
6	0.86	1.50	1.34	0.15	1.25	0.05	75.70	16.60
7	0.97	2.32	1.61	1.44	1.60	2.70	56.60	16.20
8	0.90	2.40	1.51	1.14	0.45	0.15	70.37	32.55
9	0.53	1.20	1.29	1.17	1.95	0.80	45.95	4.45
10	0.40	1.11	1.60	1.14	5.00	0.23	47.70	18.66
11	0.70	1.40	1.44	1.32	1.40	1.15	30.35	8.75
12	0.53	1.03	1.56	1.16	0.40	0.30	66.05	13.65
13	0.50	1.20	1.28	1.13	1.90	0.70	53.80	8.52
14	0.37	0.73	1.54	1.11	0.45	0.15	68.80	25.48
15	0.43	0.83	1.48	1.14	1.15	0.20	62.66	28.04
16	0.47	0.57	1.53	1.27	0.70	0.40	69.20	31.80
17	0.37	0.77	1.27	1.15	0.19	0.15	50.29	15.03

Al haber realizado el análisis estadístico de t pareada, se encontró que para los valores de ICH antes contra después de la QT hubo diferencia significativa, $p=0.001$ y además el incremento fue muy grande. La media fue de 0.64 antes de la QT (aQT) contra una de 1.63 después de la QT (dQT), se puede observar el detalle en la tabla IV.

Tabla IV: Resultados de la comparación estadística entre el ICH antes vs después de la QT.

Frecuencia de ICH	n	Media	DE
Antes	17	0.642	0.254
Después	17	1.634	0.905
DE = Desviación Estandar, Diferencia Significativa, $p=0.001$			

Para el caso del IR al comparar mediante la prueba de Wilcoxon los valores antes contra después la diferencia fué estadísticamente significativo con una $p < 0.001$, el cambio fué también muy grande, el valor de las medianas fueron de 1.46 y 1.15, antes y después respectivamente. El detalle de los resultados del análisis se muestra en la tabla V.

Tabla V: Resultados de la comparación estadística entre el IR antes vs después de la QT

IR	n	Mediana
Antes	17	1.460
Después	17	1.150
Diferencia Significativa, $p < 0.001$		

Para IM también se realizó una prueba de Wilcoxon, como se muestra en la tabla VI se obtuvieron medianas de 1.3 y 0.38 respectivamente, con lo que podemos decir que la disminución fué estadísticamente significativa con $p < 0.001$.

Tabla VI: Resultados de la comparación estadística entre el IM antes vs después de la QT

IM	n	Mediana
Antes	17	1.300
Después	17	0.380
Diferencia Significativa, $p < 0.001$		

Por último, se obtuvieron valores promedio de 63.60 en la primera muestra y de 28.30 en la segunda para IPC. De acuerdo con el análisis de t pareada, se obtuvo una diferencia promedio de 35.3 y una $p < 0.001$, también se obtuvo una disminución significativa para este biomarcador, el detalle de los valores se muestra en la tabla VII.

Tabla VII: Resultados de la comparación estadística entre el IPC antes vs después de la QT

IPC	n	Media	DE
Antes	17	63.607	17.747
Después	17	28.304	23.800
DE = Desviación Estándar, Diferencia Significativa, $p < 0.001$			

Se puede observar, la diferencia entre las medias de ICH fue de 0.991, menor antes que después de la QT. Este incremento es indicativo del daño que los fármacos causaron al ADN de las pacientes, explicado de la siguiente forma: el fármaco rompe el ADN del linfocito, los mecanismos de reparación se encargan de reparar la ruptura interrumpiendo el ciclo celular en uno de sus puntos de control, dicho proceso no siempre lleva a que la información, tomada como un segmento de la cromátide, quede en el lugar de la que fue rota, en muchas ocasiones dicho segmento se ubicará en la cromátide hermana, la cual tiene la misma secuencia que su cromátide original, y con lo que podemos ver la aparición del nuevo ICH (Benerjee A. et al, 1979; Pérez N. et al, 1999, Ortiz R, 2006). Se puede observar el comportamiento de cada caso en la figura 14.

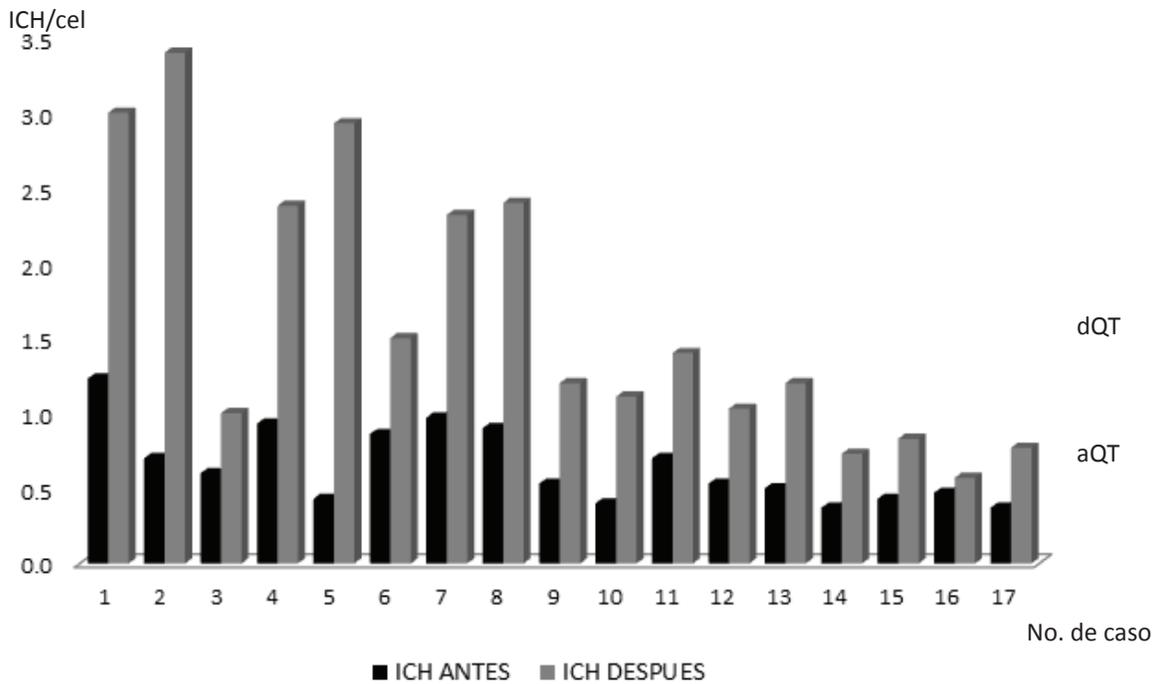


Figura 14. Resultados de ICH en las muestras antes y después de la quimioterapia. Las líneas corresponden a las medias antes (aQT) y después (dQT) del tratamiento.

Ahora, la QT tiene como objetivo destruir las células tumorales mediante el daño a su material genético, con lo que dicha célula no podrá continuar duplicándose y mucho menos sobreviviendo. El hecho de que observemos una mayor frecuencia de ICH significa que los fármacos están causando mutaciones que pueden o no conducir a muerte celular a nivel de linfocitos T, con lo que podemos correlacionarlo a que el tratamiento está siendo efectivo a nivel de células cancerígenas, las cuales son las células blanco por estar reproduciéndose más rápidamente que el resto de las células.

Pasando al IR, como se observa en la figura 15, se tuvo una mediana de 1.44 en la primera muestra contra una de 1.16 en la segunda, disminuyó 0.28 unidades. Como se ha mencionado antes, el IR es un biomarcador que nos muestra la cantidad de veces que las células se han replicado en las 72 horas de cultivo en presencia de BrdU con lo que nos indica la velocidad de replicación. El hecho de que haya disminuido significa que el ciclo celular de las células que han tenido contacto con los fármacos antineoplásicos se está alargando (López M. M. et al, 2008). Esto sucede porque al haber daño en el ADN en condiciones normales, la célula debe detener su ciclo en un punto de control para reparar dicho daño, de lo contrario no podrá continuar.

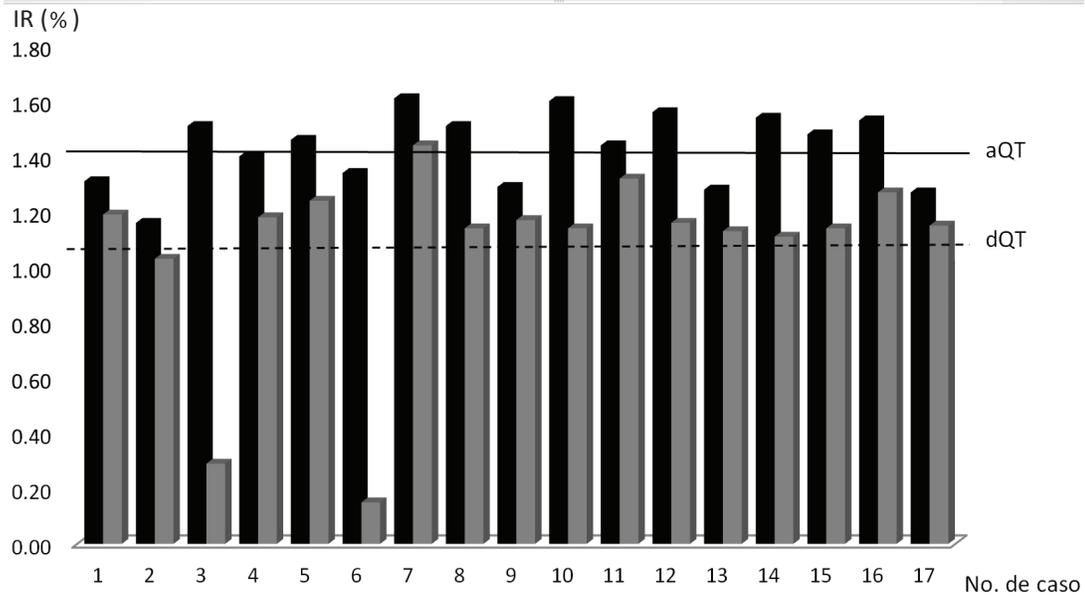


Figura 15. Resultados del IR en las muestras antes y después de la quimioterapia. Las líneas corresponden a las medianas antes (aQT) y después (dQT) de la terapia.

Para el IM se tiene una mediana de 1.3 en la primera toma y de 0.38 en la segunda toma, obteniendo un decremento de 0.92 veces. El detalle de los datos se muestra en la figura 16.

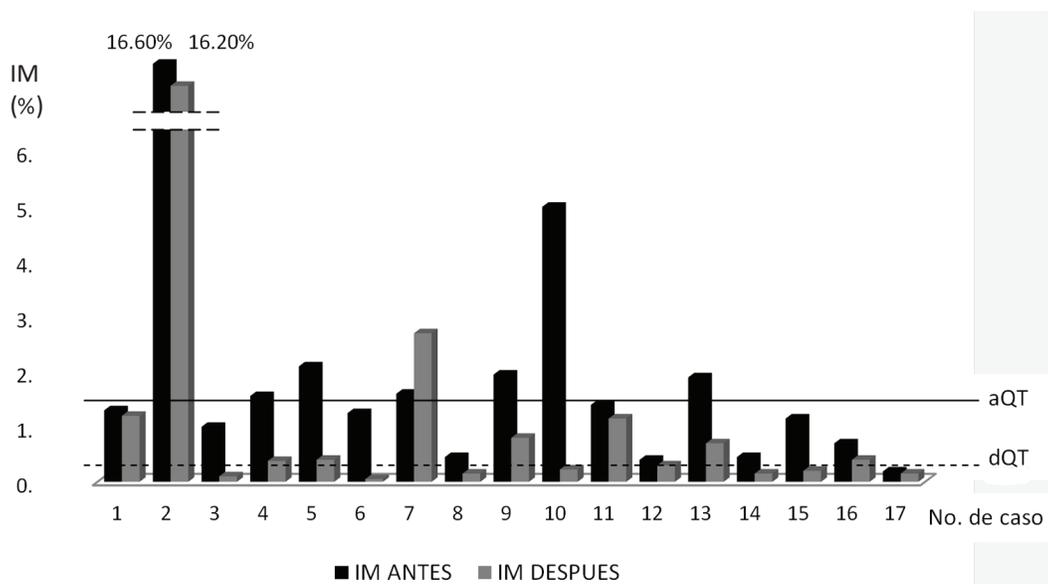


Figura 16. Resultados del IM en las muestras antes y después de la quimioterapia. Las líneas corresponden a las medianas antes (aQT) y después (dQT) de la terapia.

En el caso del IPC se obtuvo una media de 35.19% en la primera toma contra 28.30% en la segunda toma, esto es 3.33 veces menos que la primera. Los datos tanto de IM como de IPC confirman lo dicho anteriormente, el ciclo celular ha sido alargado por la reparación del daño, la información genética de las células estudiadas, daño que en este

caso fue causado por la QT. Podemos observar dichos decrementos en la figura 17.

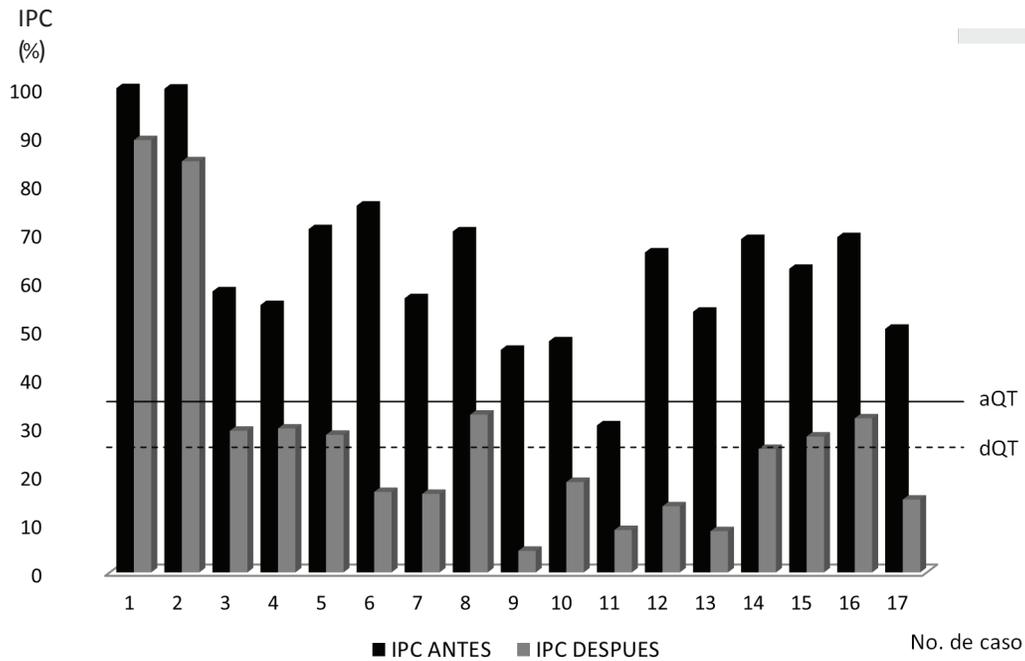


Figura 17. Resultados del IPC en las muestras antes y después de la quimioterapia. Las líneas corresponden a las medianas antes (aQT) y después (dQT) de la terapia.

Se realizó también una comparación entre el índice de ICH que presentó cada estadio, siendo éstos IIA, IIB, IIIA y IIIB. Se encontró únicamente que las diferencias entre IIA y IIB así como la de IIB y IIIA fueron significativas ($p = 0.004$ y $p = 0.036$ respectivamente). Los detalles del análisis se muestran en las tablas VIII y IX.

Tabla VIII: Resultados de la comparación estadística entre el ICH de los estadios IIA y IIB

ICH	n	Media	DE
IIA	10	0.950	0.348
IIB	11	2.642	0.735

DE = Desviación Estándar, $p=0.004$

Tabla IX: Resultados de la comparación estadística entre el ICH de los estadios IIB y IIIA

ICH	n	Media
IIA	11	4.000
IIB	9	12.000

DE = Desviación Estándar, $p=0.036$

Se ha reportado en numerosas ocasiones que la inestabilidad genética, refiriéndose a la falla en transmitir una copia exacta del genoma de la célula madre a la célula hija, puede ser uno de los factores que eleven la probabilidad de desarrollar cáncer, de hecho se dice que es una de las marcas distintivas del cáncer (Zhivotovsky et al, 2004), lo que puede explicar hasta cierto punto la diferencia de intercambios en cada estadio. Las diferencias significativas encontradas corresponden al aumento de la gravedad de la enfermedad, así que podemos suponer que cada estadio tiene mayor inestabilidad genética que el anterior, lo que lo haría más susceptible a rupturas cromosómicas y por consiguiente a ICH, explicando dichas diferencias. La pérdida de la estabilidad genética favorece el desarrollo de tumores, ya que favorece la aparición de mutantes que pueden ser seleccionados (Cahill D. P. et al, 1999).

Al observar los datos de cada caso, destaca que en el caso 2 se obtuvieron IM e IPC muy por encima de la media, tanto para los datos antes como para los de después de la quimioterapia, en especial los valores de IM (16.60 aQT y 16.20 dQT). Esto puede deberse a que la paciente haya estado en contacto con un agente mitogénico previo a su terapia, lo que aumentó la cantidad de células en división. Para corroborar éste dato se debería preguntar directamente a la paciente si ha tomado algún medicamento para saber si éste puede ser mitogénico. En este caso el decremento presentado después de la quimioterapia se presentó de acuerdo a lo esperado.

Por otro lado tenemos el caso 7, en el que el IM es mayor después que antes de la terapia (1.6 aQT contra 2.70 dQT), comportamiento que va en contra de lo que se esperaría de un tratamiento en el que se pretende matar cierto tipo de células. El hecho de que los medicamentos administrados hayan tenido un efecto mitogénico hace dudar que el tratamiento sea totalmente efectivo para está paciente. Hasta el momento en el que se revisaron los expedientes médicos, ésta paciente había recibido 5 ciclos de quimioterapia con resultados positivos, esto es que el tumor había reducido su tamaño o consistencia. Pero dado el resultado de IM, se debe poner a consideración de los médicos tratantes que su caso sea seguido muy de cerca pues puede ser indicativo de posible regresión de la enfermedad o nuevos tumores asociados.

Algo que llama la atención es la presencia de células poliploides en la primera toma en 7 de los pacientes (41.17%). Poliploidía se define como el fenómeno por el cual se originan células, tejidos u organismos con tres o más juegos completos de cromosomas. Ejemplo de ello es la figura 18. Esto es importante porque éstas células son, hasta cierto punto, células sanas, que no han sido dañadas por el tratamiento, por lo que no deberían tener mayores defectos tomando en cuenta que para este estudio no se tuvieron muestras de pacientes con metástasis, es decir, el tumor estaba localizado únicamente en la mama y ganglios axilares, no en las células sanguíneas como los linfocitos.

La presencia de poliploidía en tejidos humanos ha sido asociada a la amplificación genética necesaria en células altamente especializadas de naturaleza secretora, sin em-

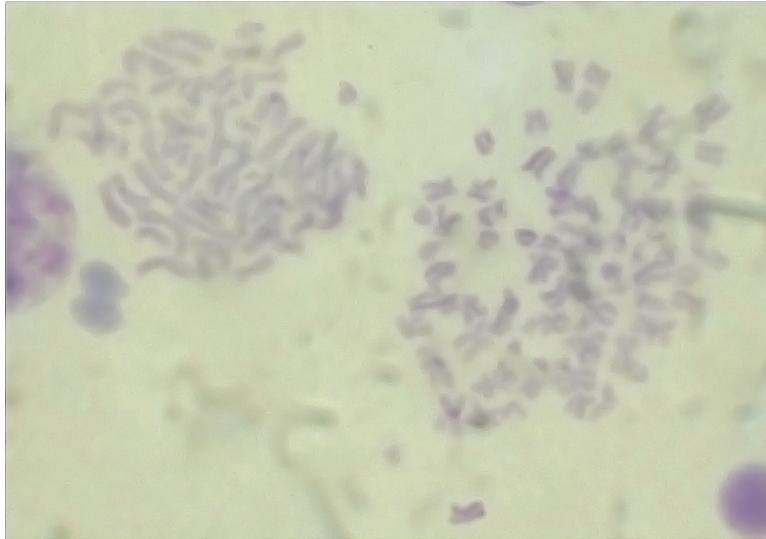


Figura 18. Metafases poliploides

bargo, también ha sido reportada su presencia en células de origen canceroso (De Donato et al, 2002). Revisando la literatura, podemos explicar éste fenómeno por medio de dos fenómenos ligados a la inestabilidad genética y por lo tanto al cáncer: errores en la citocinesis o inhibición de los puntos de control de la mitosis, ambos factores íntimamente relacionados con distintos tipos de cáncer. Se han realizado estudios en ratones en los que las células tetraploides derivadas de un cultivo con errores en la citocinesis dieron origen a cánceres epiteliales mamarios (Fujiwara T et al, 2005). Por otro lado, un punto de control de la mitosis es el mecanismo primario para asegurar que el genoma de cada nueva célula sea el correcto, se considera que el daño a este mecanismo sería una muy importante contribución al desarrollo de cáncer. Se ha encontrado que la progresión de cáncer colorectal se relaciona con puntos de control débiles que tienen inestabilidad en los microsatélites, producto de errores en la reparación del ADN (Kops J. P. G. et al 2004). Si los puntos de control han sido dañados la mitosis no se lleva a cabo correctamente, lo que puede dar como resultado aneuploidías y endoreduplicaciones.

La última explicación posible para la poliploidía se refiere a las condiciones del cultivo. Se ha señalado que el BrdU es un compuesto mutagénico por ser análogo a la timina lo que induce sustituciones de las bases, pero no se conoce que pueda inducir poliploidización, aspecto que debe ser investigado (De Donato et al, 2002).

Dado que la poliploidía puede ser indicativa de susceptibilidad al cáncer, debe ser estudiado más a fondo, ya que podría ser un biomarcador utilizable para la identificación de individuos con riesgo de cáncer.

Finalmente se analizó la correlación entre la frecuencia de ICH y la presencia/ausencia de receptores hormonales y gen HER 2-neu, comparando la frecuencia de ICH de aquellas pacientes con presencia de Receptores de Estrógenos (RE) contra aquellas con ausencia.

Y lo mismo se hizo para los receptores de progesterona (RP) y para el gen HER 2-neu, comparando:

- Frecuencia de ICH de aquellas pacientes con presencia de RP contra aquellas con ausencia de RP.
- Frecuencia de ICH de aquellas pacientes con presencia del gen HER 2-neu contra aquellas con ausencia del mismo.

Para la frecuencia de ICH en pacientes con RE presentes (RE+) se obtuvo una media de 1.496 y para su ausencia (RE-) fue de 1.70, análisis realizado con una t pareada. El análisis estadístico mostró un valor de $p = 0.670$.

Con estas comparaciones se encontró que la diferencia entre los valores entre pares de grupos no es significativa, se debe solo al azar de la variabilidad de los grupos, lo que significa que en ningún caso la frecuencia de ICH se asocia al receptor hormonal. Los resultados de las pruebas se detallan en la tabla X.

Tabla X: Resultado del análisis estadístico de la relación entre la presencia/ausencia de Receptor de Estrógeno y la frecuencia de ICH

RE	n	Media	DS
+	9	1.496	0.690
-	7	1.701	1.191

+ = Receptor de Estrógenos positivo, - = Receptor de Estrógenos negativo;
Sin diferencia significativa, $p = 0.670$

En el caso de la frecuencia de ICH en pacientes con RP presentes (RP+) se obtuvo, por medio del análisis U de Mann-Whitney, una mediana de 1.64 en presencia del receptor y para su ausencia (RP-) fue de 1.030. Se obtuvo una $p = 0.386$. Se encontró que la diferencia entre pares de grupos tampoco es significativa. Los resultados puntuales de las pruebas se muestran en la tabla XI.

Tabla XI. Resultados del análisis estadístico de la relación entre la presencia/ausencia de Receptor de Progesterona y la frecuencia de ICH.

RP	n	Media
+	5	1.500
-	9	1.030

+ = Receptor de Progesterona positivo, - = Receptor de Progesterona negativo; Sin diferencia significativa, $p = 0.386$

Para la frecuencia de ICH en pacientes con HER 2-neu presente se obtuvo una media de 1.00, y para su ausencia fue de 1.30. Se obtuvo una $p = 0.571$, con lo que se encuentra que la diferencia entre éstos grupos no es significativa. Los resultados de las pruebas se muestran en la tabla XII.

Tabla XII. Resultados del análisis estadístico de la relación entre la presencia/ausencia del gen HER 2-neu y la frecuencia de ICH.

HER 2-neu	n	Media	25%	75%
+	13	1.000	0.730	2.930
-	14	1.300	0.980	2.385

+ = positivo a la presencia del gen, - = negativo a la presencia del gen.

Se puede ver, en ninguna de las pruebas realizadas se obtuvo diferencia significativa, lo que nos indica que la presencia o ausencia de los receptores hormonales en las pacientes no está relacionada de ninguna manera con los valores de ICH de las muestras, es decir con el nivel de afectación del medicamento a las células. Este dato concuerda con el hecho de que los receptores hormonales son utilizados solamente como indicador de si la paciente es candidato para la hormonoterapia (Breast cancer.org, 2013), si la paciente no presenta receptores hormonales no se considera candidata. Lo mismo ocurre para el gen HER2-neu, dado que su proteína (HER2) estimula la división y el crecimiento de las células, su presencia o ausencia es usada como indicador de la posible respuesta al tratamiento y de elección del mismo (Oncology, nurse edition, 2009), pero no es indicador de inestabilidad o debilidad cromosómica.

2. CONCLUSIONES

Los resultados indican que los biomarcadores probados, ICH, IR e IPC pueden servir como indicadores para la evaluación temprana de respuesta al tratamiento con A/C.

La respuesta al tratamiento hasta el momento de corte para esta etapa de la investigación, muestran una respuesta favorable e independiente de la presencia de los receptores hormonales y el gen HER 2-neu.

Las diferencias encontradas entre antes y después del tratamiento de los biomarcadores probados no se asocian con la presencia de los receptores hormonales o del gen HER 2-neu.

3. RECOMENDACIONES

Dado que los pacientes que participaron en el estudio tuvieron hasta el momento de la última recolección de datos respuestas satisfactorias al tratamiento, hace falta conocer el comportamiento de los biomarcadores en pacientes que no han tenido buena respuesta al tratamiento con A/C.

Vale la pena también continuar la investigación en torno al fenómeno de poliploidia en células sin QT para conocer si es posible considerarlo para la identificación de individuos con mayor susceptibilidad al desarrollo de cáncer.

REFERENCIAS

- ALPHARMA. (1999). Colombia. Versión en línea en: <http://www.medicentro.com.co/TERAPEUTICA-STAR/Doxorubicina.htm> (13-ene-2013).
- Anaise D. (2012). Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. Versión en línea en: <http://www.danaise.com/breast.html> (14-ene-2013).
- Anderson D, Francis A. J, Godbert P, Jenkinson P. C, Butterworth K. R. (1986). Chromosome aberrations (CA), sister-chromatid exchanges (SCE) and mitogen-induced blastogenesis in cultured peripheral lymphocytes from 48 control individuals sampled 8 times over 2 years. *Mutation Research* 250, (1-2), 467-476.
- Arce C, Martínez-Tlahuel J, Lara F. U. (2006). Quimioterapia adyuvante en cáncer de mama: presente y futuro. *Cancerología*, 1177-185.
- Banerjee A. and Benedict W. F. (1979). Production of sister chromatid exchanges by various cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Research*, 39: 797-799.
- Bender M. A, Preston R. J, Leonard R. C, Pyatt B. E, Gooch P. C, Shelby . (1988). Chromosomal aberration and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. *Mutation Research*, 204, (3) 421-433.
- Boticario C, Cascales M. (2008). *Inovaciones en cancer*. Universidad Nacional de Educación a Distancia. España.
- Breast Cancer Organization. (2013). Versión en línea en http://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/estado_hormonal. (7-feb-2013).
- Cahill D. P, Kinzler K. W, Vogelstein B, Lengauer, C. (1999), Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 9: M57-M60.
- Consenso nacional sobre cáncer mamario (CNCM). (2011). Cuarta revisión: Elsevier. México.
- Contreras N.C, Silva C. T, Mateus H. E. (2009). *Citogenética aplicada a la medicina*. Editorial Universidad del Rosario. Colombia. 14-16.
- Crossen P. E (1972). *Sister chromatid exchange in lymphocytes*. 150 fifth Avenue, New York. 175-193.
- Dámasco S, Reques P, Gonzalez-Carreró M. I, Fernandez C. (2011). *Curso de Biogerontología, materiales de clase*. Universidad de Cantabria. Versión en línea en: <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/biogerontologia/materiales-de-clase-1/capitulo-8.-danos-en-el-genoma-y-el-envejecimiento/8.3-mecanismos-de-reparacion-del-adn>.
- Damjanov I. (2000). *Pathology for the health-related professions*. 2° edición: W. B. Saunders Company. EUA.
- De Donato M, Mimbela I. (2002). Anormalidades citogenéticas de líneas estables de fibroblastosbovinos. *Revista científica, FCV-LUZ*. XII:5, 388-394.
- Díaz B. N, Lara P.C, Bosch D. N, Díaz D.D. (2010). Generalidades de las bases moleculares de la radiación. *Aplicaciones clínicas. Biocancer, research journal*. Versión en

línea en <http://www.biocancer.com/journal/316/4-dano-en-el-adn-mecanismos-efectores-y-detencion-el-ciclo-celular>. (9-01-2013).

- Diaz E, García J. (2000). *Oncología clínica básica*. Ediciones Aran. España, 371-387.
- Donegan W. L. (1997). Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *Cancer*, 47: 28-51.
- Eynard A, Valentich M, Rovasio R. (2008). *Histología y embriología del ser humano*. 4° edición: Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires, 575.
- Fenech M, Chang W. P, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534: 65-75.
- Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova E. V, Bronson R. T, Pellan D. (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature*, 437: 1043-1047.
- Galloway S. M, Ardena M. J, Ishidate M, Ivett J. L, Kirkland D. J, Morita T, Mosesso P, Sofuni T. (1994). Report from working group on in vitro test for chromosomal aberrations. *Mutation Research*, 312: 241-261.
- Gonzalez J. M, Medina J.M. (2001). *Patología Molecular*. Editorial Mc Graw Hill. España.
- Haglund U, Hayder S, Zech L. (1980). Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in children after treatment for malignant lymphoma. *Cancer Research*, 40:4786-4790.
- Hatzis, L. Pusztai, D. Phil, V. Valero, D. J. Booser, L. Esserman. (2011) *Journal of American Medical Association*. Versión en línea en <http://jama.ama-assn.org/content/305/18/1873>.
- Herruzo I. (2004). Tratamiento hormonal del cáncer de mama. *Oncología*, 27(7): 427-434.
- Hulka B. S, Wilcosky T. C, Rynard, S. M, Griffith J. D. (1990). *Biological markers in epidemiology*. Cap 6: Sister Chromatid Exchanges. Oxford University Press, 105-112.
- Ikbali M, Atasoy M, Pirim I, Aliagaoglu C, Karatay S, Erdem T. (2006). The alteration of sister chromatid exchange frequencies in Bechet's disease with and without HLA-B51. *J. Eur. Acad. Dermatol*, 20, 149-52.
- Instituto Nacional de Cáncer. Versión en línea en <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es> (31-oct-2011).
- Ishii Y, Bender M. A. (1978). Factors influencing the frequency of mitomycin C induced sister chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine substituted human lymphocytes in culture. *Mutation Research*, 51: 411-418.
- Karaman A, Binici D. N, Kalabar M. E, Dursun H, Kurt A. (2008). Alteration of sister chromatid Exchange frequencies in gastric cancer and chronic atrophic gastritis

patients with and without H. pylori infection. World Journal of gastroenterology; 14(16): 2534-2539.

- Karki N.T, Ilonen J, Reunanen M. (1986). Increased sister-chromatid exchange rate and its regression during prolonged incubation in lymphocyte cultures from patients with multiple sclerosis. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 160, 3, 215-219.
- Kato H. (1974). Spontaneous sister chromatic exchange detected by a BrdU-labeling method. Nature (London), 251: 70-72.
- Katzung B. (1996). Farmacología Básica y Clínica. 6ª edición: El manual moderno, México. 1009-1023.
- Khosravi P, Izarzugaza Y, Encinas S, Díaz V. M, Pérez G. (2008). Tratamiento adyuvante en el cáncer de mama operable. Anales de Medicina Interna, 25(1) 36-40.
- Kirby J, Copeland E. M. (2000). La mama, manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas, Tomo I. 3ª edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Kops G. J. P, Foltz D. R, Cleveland D. W. (2004). Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. PNAS, 101:23 8699-8704.
- Krishna G, Xu J, Nath J, Petersen M, Ong T. (1985). In vivo cytogenetic studies on mice exposed to ethylene dibromide. Mutation Research. 158: 81-87.
- La hormonoterapia en el cáncer de mama en la Farmacéutica Janssen. (2011). Versión en línea en http://www.janssen.es/bgdisplay.jhtml?itemname=anemia_cancer_tratamiento_hormonoterapia.
- Laboratorios Filaxis. (2002). Ficha técnica, Ciclofosfamida. Argentina. Versión en línea en http://www.filaxis.com/pdf/ciclofosfamida_prospecto_11-04.pdf (13-ene-2013).
- Laboratorios Filaxis. (2002). Ficha técnica, Doxorubicina. Argentina. Versión en línea en http://www.filaxis.com/pdf/doxorubicina_prospecto_05-04.pdf (13-ene-2013).
- Lacadena J.R. (1996). Citogenética. 1ª edición: Editorial Complutense S. A. 149-152, 208.
- Lambert B, Lindbland A, Holmberg L, Francesconi D. (1982). The use of sister chromatid exchange to monitor human populations for exposure to toxicologically harmful agents. En: Sister chromatid exchanges (S. Wolff, Ed.), Wiley Nueva York, 149-182.
- Latt S. A, Schereck R. R. (1980). Sister Chromatid exchange analysis. American Journal of Human Genetics 32: 297-313.
- Lewin B. (1994). Genes. 2ª edición: Editorial Reverté.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser A. A, Krieger M, Scott M. P, Zipursky S. L, Darnell J. (2005). Biología Celular y Molecular. Editorial Panamericana. 935-972.

- López M, Portmann E, Angeleri G, Gurni A, Carballo M. A. (2009). Biomarcadores para evaluación de genotoxicidad potencial. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (2), 154 – 159.
- López M. M, Carballo M. A. (2008). Los nitroimidazoles como modelo de mutagénesis química y muerte celular. *Chile. Theoria*, 17,2:47-62.
- Madrigal E, Cassani M. (1996). Efecto mutagénico de la mitomicina C en cultivos de linfocitos humanos. *Bioquímica*, 21:3, 84.
- MD. Anderson Cancer Center. (2010). Inmunoterapia: reforzar la lucha del organismo contra el cáncer. Versión en línea en <http://www2.mdanderson.org/depts/oncolog/sp/articles/10/3-mar/3-10-hc.html> , *OncoLog*, Vol. 55, No. 3.
- Medmol, glosario de Medicina Molecular. Versión electrónica en <http://www.medmol.es/glosario/55/>. 9/enero/2013.
- Meyer J. S. (1995). Cell kinetics of breast and breast tumors. En Donegan W. L, Spratt J. S. *Cancer of the breast*. Philadelphia. W. B. Saunders Co. Versión en línea en: <http://books.google.com.mx/books?id=RZprAAAAMAAJ&q=cancer+of+the+breast,+donegan&dq=cancer+of+the+breast,+donegan&hl=es&sa=X&ei=ZXD0UNGZKqGY2AXf-YHgAQ&ved=0CDIQ6AEwAQ>.
- Mohar A, Frias M, Suchil L, Mora T, de la Garza J. G. (1997). Epidemiología descriptiva del cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. *Salud Pública de México*, 39, No. 004. Versión en línea en <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/106/10639402.pdf> .
- Morales-Ramírez P. (1980). Analysis in vivo of sister chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary gland cells. *Mutation Research* 74: 61-69.
- Müller-Sterl W. (2008). *Biología: fundamentos para la medicina y ciencias de la vida*. Reverté. España. 447-457 .
- Norppa H. (2004). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol. Lett.* 149, 309–334.
- Oncology, nurse edition. (2009). Versión en línea en imaging.ubmmedica.com/.../July-09-Pt-Guide_GEN_revs2-2.pdf (7-feb-2013).
- Organización Mundial de la Salud. (1981) *Histological Typing of Breast Tumors*. 2ª edición: Geneva.
- Ortiz R, Rodríguez L, Cortez E, Nájera O, Medina H, González C. (2006) Estudios sobre el material genético en desnutrición. *Tópicos de Genética*. 1ª edición, Universidad Autónoma del Estado de México, México, 277-296.
- Painter R. B. (1980). A replication model for sister chromatid exchange. *Mutation Research*, 70, 337-341.
- PEMEX. (2008). *Boletín tu salud, cáncer de mama*. No. 17, año 4. Versión en línea en http://www.serviciosmedicos.pemex.com/salud/boletin/boletin_17/index.html (11-ene-2013).

- Pérez N, Ceballos J. M, Pinto D. (1999). Prevalencia de intercambio de cromátides hermanas en una población libre de exposición a agentes clastogénicos. *Revista Biomedica*; 10:71-76. México.
- Perry P & Wolff S. (1974). New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*. 251: 156-158.
- Prosnitz L. R, Iglehart J. D, Winer E. P. (2003). *Oncología clínica, enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes*. 8° edición: El sevier. España.
- Raposa T, Várkonyi J. (1987). The relationship between sister chromatid exchange induction and leukemogenicity of different cytostatics. *Cancer detection and prevention*. 10:141-151.
- Renner HW, Münzner R. (1982). Genotoxicity of cocoa examined by microbial and mammalian systems. *Mutation Research*, 103(3-6):275-81.
- Repetto M, Sanz P. (1995). *Glosario de términos toxicológicos*. Asociación Española de Toxicología. Sevilla, España.
- Richards V. (1978). *Cancer: the wayward cell: its origins, nature, and treatment*. 2° edición: Universidad de California Press. EUA.
- Sanofi-Aventis. (2005). Versión en línea en: [http://www.elmundo.es/elmundo Diaz E. et al, 2000 salud/especiales/cancer/mama2.html](http://www.elmundo.es/elmundo/Diaz E. et al, 2000 salud/especiales/cancer/mama2.html) (13-ene-2013).
- Servicio Andaluz de Salud (SAS). (2011). *Anatomía y Fisiología del Aparato Reproductor Masculino y Femenino (en español)*. Editorial CEP. Versión en línea en http://sas.editorialcep.com/muestra/muestra_matronas.pdf (1-nov-2011).
- Solari A. J. (2004). *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*. 3° edición, 1° reimpresión octubre de 2007: Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires, 231.
- SSA. (2002). *Programa de acción: Cáncer de mama*. 1° edición. Secretaría de Salud (SSA). México. Versión en línea en http://www.cjs.com.mx/PDF/documentos/Programa_de_Accion_cancer_mama.pdf (6-nov-2011).
- Tirado N., Ascarrunz M.E. Cuti M. (2005). Detección de daño genotóxico en niños expuestos a metales pesados en Alto Lima-La Paz. *BIOFARBO*, XIII: 11-18.
- Tucker, J.D, Christensen, M.L, Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research Letters*, 190 (3), 225-228.
- Tucker J. D, Wyrobek A. J, Ashworth L. K, Christensen M. L, Burton G. V, Carrano A. V, Evenson R. E. (1990). Induction, accumulation, and persistence of sister chromatid exchanges in women with breast cancer receiving cyclophosphamide, adriamycin, and 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Research*, 50:4951-4956.
- Universia México. 2012. Versión en línea en: <http://noticias.universia.net.mx/enportada/noticia/2012/04/05/921938/cancer-mama-cada-dos-horas-muere-mexicana-causa-esta-enfermedad.html> (12-ene-2013).

- Veronese S. M, Gambacorta M, Gottardi O. (1993) Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 71: 3926-3931.
- Vogel C. L, Cobleigh M. A, Tripathy D, Gutheil J. C, Harris L. N, Fehrenbacher L, Slamon D. J, Murphy M, Novotny W. F, Burchmore M, Shak S, Stewart S. J, Press M. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*; 20:719-726.
- Weiss G. R. (1997). *Oncología Clínica. Editorial manual moderno. México.*
- Wolf-Dieltrich H. (2004). A new deal for holliday junctions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 117-119.
- Yarden Y, Sliwkowski M. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2:127-137.
- Zhivotovsky B, Kroemer G. (2004). Apoptosis and genomic instability. *Nature*. 5: 752-762.
- Imágenes google: www.google.com.mx .



ANEXOS

INDICE DE ABREVIATURAS

- A/C*** *Adriamicina – Ciclofosfamida*
- aQT*** *Antes de la Quimioterapia*
- BrdU*** *5-Bromodesoxiuridina*
- dQT*** *Después de la Quimioterapia*
- ICH*** *Intercambio de Cromátides Hermanas*
- IM*** *Índice Mitótico*
- IPC*** *Índice de Proliferación Celular*
- IR*** *Índice de Replicación*
- PHA*** *Fitohemaglutinina*
- QT*** *Quimioterapia*
- RE*** *Receptores de Estrógenos*
- RP*** *Receptores de Progesterona*

Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Química
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Intercambio de cromátides hermanas inducidos por el tratamiento en pacientes con cáncer de mama”

Titular del proyecto: p. Jimena Garibay García

Asesor Académico: Dra. Julieta Castillo Cadena

Asesor Externo: M.O. Paula Anel Cabrera Galeana

FECHA: _____

El que suscribe _____, manifiesto que me ha sido informado (a) que la Universidad Autónoma del Estado de México a través de la Facultad de Química, se encuentra realizando una investigación titulada: “Evaluación de los Polimorfismos y Actividad Enzimática de la Glutación S-Transferasa en Mujeres con cáncer de Mama y su relación con en Tratamiento”.

Mi participación en esta investigación consta de una donación voluntaria de sangre antes de la aplicación del tratamiento de Quimioterapia dentro de las instalaciones del Centro Oncológico Estatal ISSEMyM y una segunda toma de muestra después de la aplicación del mismo.

El proceso de la toma de muestra es el siguiente:

Toma de una muestra de aproximadamente 4 mL de sangre por venopunción con material estéril y desechable en la parte anterior del brazo a la altura del codo, en un tubo de heparina (color verde) por parte del químico a cargo.

Hago constar que:

- Se me ha explicado ampliamente sobre las características y objetivos que se esperan alcanzar con esta investigación.
- Se me ha asegurado que dicho procedimiento no tiene riesgos mayores para mi integridad física, ocasionalmente puede presentarse un moretón en el lugar de la toma de muestra.
- Tengo el beneficio de solicitar información adicional sobre el proyecto y que se aclaren todas mis dudas sobre mi participación en este estudio
- Se me ha asegurado que la información que proporcione y que se genere será confidencial y anónimo
- Por lo que declaro libre y voluntariamente que acepto participar en este estudio.

NOMBRE DEL PARTICIPANTE	FIRMA
_____	_____
NOMBRE DEL QUÍMICO A CARGO	FIRMA
_____	_____
NOMBRE DEL PRIMER TESTIGO	FIRMA
_____	_____
NOMBRE DEL SEGUNDO TESTIGO	FIRMA
_____	_____

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Bromodioxiuridina (BrdU)(Sigma)

Pesar 2 mg de BrdU por cada 10mL de agua destilada.

Concentración final: 10 µg/mL de cultivo.

Buffer de diferenciación

2.36 g de citrato trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$)

Disolver en 100 mL de agua destilada.

Llevar a pH de 7.0 con fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$) (0.221 g en 10mL de agua destilada).

Buffer de fosfatos

0.70g de Fosfato monobásico de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$).

0.69g de Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4).

Disolver en 100mL de agua destilada.

Colchicina (Sigma) solución 10µg/mL.

Solución Stock: 10 mg de colchicina.

10mL de agua destilada estéril.

Solución de trabajo: De la solución stock, tomar 2mL y llevarlo a 10mL.

Fijador Carnoy 3:1

75mL metanol.

25mL ácido acético glacial.

Giemsa (Sigma)

Solución stock: 0.8g de Giemsa en polvo:

50mL de Glicerina.

50mL de Alcohol metílico.

Calentar la glicerina a 60°C, agregar Giemsa y mover hasta disolución completa, dejar que la solución se atempere y agregar el alcohol metílico lentamente.

Solución de trabajo (10%): Mezclar 5 mL de solución stock en 45 ml de buffer de fosfatos.

Hoechst 33258 (Sigma)

Solución Stock: 0.025g de Hoechst 33258

Disolver en 10 mL de agua destilada.

Se hacen alícuotas de 1 ml y se congelan hasta ser necesitadas protegidas de la luz.

Solución de trabajo: A una de las alícuotas añadir 10 ml de agua destilada. Proteger de la luz.

Medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)

Preparar según las especificaciones del inserto:

1. Medir 90% del volumen necesario de agua, dependiendo del contenido del envase de medio. La temperatura del agua debe ser de 15 a 20°C.

2. Agregar el medio en polvo mientras se agita gentilmente. Agitar hasta que se disuelva completamente. No calentar.

3. Enjuagar el envase original con una pequeña cantidad de agua para limpiar el envase. Agregar a la solución del paso 2. NOTA: Puede ser necesario bajar el pH a 4.0 con HCl 1N para disolver completamente el producto. Una vez que se ha disuelto completamente, subir el pH a 7.2 con NaOH 1N antes de añadir el bicarbonato de sodio.

4. Agregar 2.0g de bicarbonato de sodio o 26.7 mL de solución de bicarbonato de sodio (7.5% w/v) a la solución del paso 3, por cada litro del volumen final a preparar. Agitar hasta disolución.

5. Ajustar el pH del medio a 0.1-0.3 unidades debajo del deseado, mientras se agita. El pH puede subir al filtrar. Se recomienda el uso de HCl 1N o NaOH 1N.

6. Agregar agua hasta completar el volumen final deseado.

7. Esterilizar inmediatamente mediante filtración usando una membrana con porosidad de 0.22 micrones.

8. Almacenar asépticamente el medio en un contenedor estéril.

Solución 2X SCC

1.75g de Cloruro de sodio (NaCl).

0.88g Citrato trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$).

Aforar a 100mL de agua destilada.

Solución hipotónica de KCl (0.075M)

0.559 g KCl (J.T.Baker).

Aforar a 100 mL con agua destilada.